

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 9/16, 15/55, C12P 19/32	A1	(11) 国際公開番号 WO96/37603 (43) 国際公開日 1996年11月28日 (28.11.96)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/01402 (22) 国際出願日 1996年5月24日 (24.05.96) (30) 優先権データ 特願平7/149781 1995年5月25日 (25.05.95) JP 特願平8/94680 1996年3月26日 (26.03.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)[JP/JP] 〒104 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 三原康博(MIHARA, Yasuhiro)[JP/JP] 宇多川隆(UTAGAWA, Takashi)[JP/JP] 〒210 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa, (JP) 山田秀明(YAMADA, Hideaki)[JP/JP] 〒606 京都府京都市左京区松ヶ崎木の本町19-1 Kyoto, (JP) 浅野泰久(ASANO, Yasuhisa)[JP/JP] 〒930 富山県射水郡小杉町太閤山9-3-1-321 Toyama, (JP)		(74) 代理人 弁理士 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 BR, CA, CN, HU, JP, KR, PL, US, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : PROCESS FOR PRODUCING NUCLEOSIDE-5'-PHOSPHATE (54) 発明の名称 ヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法 <div data-bbox="535 1218 990 1533"> <p>5'-イノシン酸 (g/dl) ρ</p> <p>反応時間 (h) b</p> <p> \square pH5.5 \blacktriangle pH5.0 \triangle pH4.5 \circ pH4.0 \circ pH3.5 </p> </div> <p>a ... 5'-Inosinic acid (g/dl) b ... Reaction time (h)</p> (57) Abstract <p>A process for efficiently and economically producing a nucleoside-5'-phosphate which comprises treating a nucleoside and a phosphoric acid donor selected from the group consisting of poly-phosphoric acid (salts), phenylphosphoric acid (salts) and carbamylphosphoric acid (salts) with an acid phosphatase, in particular one suffering from a decrease in the nucleotidase activity, at a pH value of 3.0 to 5.5 to thereby form a nucleoside-5'-phosphate and taking up the same.</p>		

(57) 要約

酸性フォスファターゼ、特にヌクレオチダーゼ活性が低下した酸性フォスファターゼをpH3.0~5.5の条件下でヌクレオシド並びにポリ磷酸（塩）、フェニル磷酸（塩）及びカルバミル磷酸（塩）から成る群より選択される磷酸供与体に作用させてヌクレオシド-5'-磷酸エステルを生成せしめ、これを採取することによって、安価かつ効率的にヌクレオシド-5'-磷酸エステルを製造する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	SD	スーダン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア共和国	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド		マリ	TG	トーゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MR	モリタニア	TR	トルコ
CH	スイス			MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CN	中国	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	アメリカ合衆国
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム
		KZ	カザフスタン				

- 1 -

明細書

ヌクレオシド-5'-リン酸エステルの製造法

技術分野

本発明は、ヌクレオシド-5'-リン酸エステルの製造法に関する。また、本発明は、ヌクレオシド-5'-リン酸エステルの製造において有用な新規な酸性フォスファターゼ、該酸性フォスファターゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えDNA、該組換えDNAを保有する微生物に関する。ヌクレオシド-5'-リン酸エステルは、調味料、医薬並びにそれらの原料等として有用である。

背景技術

ヌクレオシドを生化学的にリン酸化してヌクレオシド-5'-リン酸エステルを製造する方法としては、リン酸供与体として、パラニトロフェニルリン酸を用いる方法（特公昭39-29858号）、無機リン酸を用いる方法（特公昭42-1186号）、ポリリン酸を用いる方法（特開昭53-56390号）、アセチルリン酸を用いる方法（特開昭56-82098号）、アデノシン三リン酸（ATP）を用いる方法（特開昭63-230094号）が知られている。しかしながら、これらの方法にあっては使用する基質が高価であったり、反応副生物が生じたりするために、安価かつ効率的にヌクレオシド-5'-リン酸エステルの生産を行うには満足のいくものではなかった。

そこで、本発明者らは、特定の微生物菌体を、酸性条件下でヌクレオシド並びにポリリン酸（塩）、フェニルリン酸（塩）及びカルバミルリン酸（塩）よりなる群より選択されるリン酸供与体に作用させることにより、2'-、3'-ヌクレオチド異性体の副生を伴うことなく、ヌクレオシド-5'-リン酸エステルを効率よく生成する方法を開発した（特開平7-231793号）。

しかしながら、この方法においても、使用する微生物菌体にわずかながら存在するヌクレオシド分解活性のために反応中に基質が一部分解され、また、反応を継続すると生成蓄積したヌクレオシド-5'-リン酸エステルが分解するため、反

応液中に副生物が生成するとともに、十分な収率が得られなかった。さらに、菌体あたりの磷酸転移活性が低いため、高濃度の基質を添加して反応を行えない等の欠点があった。

発明の開示

本発明の目的は、安価かつ効率的なヌクレオシド-5'-磷酸エステルの製造方法を提供することである。また、本発明の他の目的は、ヌクレオシド-5'-磷酸エステルの製造方法において有用な酵素、該酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えDNA及び該組換えDNAを保有する微生物を提供することである。

本発明者らは、従来の方法よりも効率の良いヌクレオシド-5'-磷酸エステルの製造方法を開発するために種々の検討を加えた結果、微生物の無細胞抽出液より精製した酸性フォスファターゼをpH3.0~5.5の条件下でヌクレオシド並びにポリ磷酸（塩）、フェニル磷酸（塩）及びカルバミル磷酸（塩）から成る群より選択される磷酸供与体に作用させることにより、高収率で効率良くヌクレオシド-5'-磷酸エステルを生産することができることを発見した。さらに、種々の細菌より酸性フォスファターゼをコードする野生型遺伝子を、モルガネラ属細菌及びエシェリヒア属細菌より磷酸エステル加水分解活性が低下した変異型酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を取得することに成功し、遺伝子工学的手法により該遺伝子を大量発現させることによりヌクレオシド-5'-磷酸エステルの生産性が飛躍的に向上することを見だし、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、酸性フォスファターゼ、好ましくはヌクレオチダーゼ活性が低下した酸性フォスファターゼをpH3.0~5.5の条件下でヌクレオシド並びにポリ磷酸（塩）、フェニル磷酸（塩）及びカルバミル磷酸（塩）から成る群より選択される磷酸供与体に作用させてヌクレオシド-5'-磷酸エステルを生成せしめ、これを採用することを特徴とするヌクレオシド-5'-磷酸エステルの製造法を提供するものである。

また、本発明は、磷酸エステル加水分解活性が低下した変異型酸性フォスファターゼ、該酸性フォスファターゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えD

NA、並びに該組換えDNAを保有する微生物を提供するものである。

また、本発明は、エシェリヒア属、エンテロバクター属細菌、クレブシエラ属細菌及びセラチア属細菌に由来する新規酸性フォスファターゼ、これらをコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えDNA、並びに該組換えDNAを保有する微生物を提供するものである。

以下、本発明を詳細に説明する。

< 1 > 酸性フォスファターゼの取得

本発明において使用される酸性フォスファターゼは、pH3.0～5.5の条件下で、ヌクレオシドへの、ポリリン酸（塩）、フェニルリン酸（塩）及びカルバミルリン酸（塩）よりなる群より選択されるリン酸供与体からの、リン酸基の転移によりヌクレオシド-5'-リン酸エステルを生成する反応を触媒するものであれば制限はない。このような酸性ホスファターゼとしては、微生物に由来するものが好ましく、特に好適な例として、モルガネラ属、エシェリヒア属、プロビデンスシア属、エンテロバクター属、クレブシエラ属又はセラチア属に属する細菌が、当該酵素活性を有しており、これら細菌に由来する酵素がある。そのような細菌の代表例として以下のような菌株を挙げることができる。

モルガネラ・モルガニ (*Morganella morganii*) NCIMB 10466

モルガネラ・モルガニ (*Morganella morganii*) IFO 3168

モルガネラ・モルガニ (*Morganella morganii*) IFO 3848

エシェリヒア・ブラッタエ (*Escherichia blattae*) JCM 1650

エシェリヒア・ブラッタエ (*Escherichia blattae*) ATCC 33429

エシェリヒア・ブラッタエ (*Escherichia blattae*) ATCC 33430

プロビデンスシア・スチュアルティ (*Providencia stuartii*) ATCC 29851

プロビデンスシア・スチュアルティ (*Providencia stuartii*) ATCC 33672

エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) IFO 12010

エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) IFO 13534

クレブシエラ・プランティコラ (*Klebsiella planticola*) IFO 14939

クレブシエラ・プランティコラ (*Klebsiella planticola*) IAM 1133

セラチア・フィカリア (*Serratia ficaria*) IAM 13540

セラチア・マルセセンス (*Serratia marcescens*) IAM 12143

なお、酸性フォスファターゼ (EC 3.1.3.2) は、本来、磷酸エステルを酸性条件下で加水分解する反応を触媒する酵素であり、磷酸転移反応により生成するヌクレオシド-5'-磷酸エステルを分解するヌクレオチダーゼ活性（以下、「磷酸エステル加水分解活性」という）を有している。本発明のヌクレオシド-5'-磷酸エステルの製造法においては、このような酸性フォスファターゼでも使用することができるが、高い収率でヌクレオシド-5'-磷酸エステルを得るためには、上記の細菌が産生する野生型の酸性フォスファターゼに比べて磷酸エステル加水分解活性が低下した変異型酸性フォスファターゼ（以下、単に「変異型酸性フォスファターゼ」ともいう）を使用することが望ましい。

変異型酸性フォスファターゼは、後述するように、酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を直接変異させることによって得られる変異型遺伝子を発現させることによって得られるが、酸性フォスファターゼを産生する微生物を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 等の通常人工突然変異に用いられている変異剤により処理し、磷酸エステル加水分解活性が低下した変異型酸性フォスファターゼを産生するようになった微生物を培養することによっても、変異型酸性フォスファターゼを得ることができる。

上記のような微生物から酸性フォスファターゼ活性を有する蛋白質を得るには、該活性を有する菌株を適当な培地で培養し、増殖した菌体を回収し、当該菌体を破碎して無細胞抽出液を調製して、これより必要に応じ精製すればよい。

微生物を培養する培地には格別の制限はなく、通常の炭素源、窒素源、無機イオン及び必要ならば有機栄養源を含む通常の培地でよい。炭素源としては、グルコース、シュクロース等の糖類、グリセロール等のアルコール類、有機酸その他が適宜使用される。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩その他が用いられる。無機イオンとしては、マグネシウムイオン、磷酸イオン、カリウムイオン、鉄イオン、マンガンイオンその他が必要に応じ適宜使用

される。有機栄養源としては、ビタミン、アミノ酸等、又はこれらを含む酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー、カゼイン分解物、大豆加水分解物等が適宜用いられる。

培養条件にも格別の制限はなく、例えば、好氣的条件下にてpH 5～8及び温度25～40℃の範囲内でpH及び温度を適当に制御しつつ12～48時間程度培養を行えばよい。

増殖した菌体は、遠心分離等により培養液から回収することができる。回収した菌体から無細胞抽出液を調製するには、通常の方法が用いられる。すなわち、菌体を超音波処理、ダイノミル、フレンチプレス等の方法にて破碎し、遠心分離により菌体残渣を除去することにより無細胞抽出液が得られる。

無細胞抽出液から酸性フォスファターゼを精製するには、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、等電点沈殿等、酵素の精製に通常用いられる手法が適宜組み合わせて用いられる。精製は、完全精製である必要は必ずしもなく、基質のヌクレオシドの分解に関与する酵素等の夾雑物が除去できればよい。

< 2 > 酸性フォスファターゼ遺伝子の取得

酸性フォスファターゼ活性を有する蛋白質をコードする構造遺伝子を含むDNA断片は、当該酵素活性を有する微生物等の細胞からクローニングすることができる。クローニング方法としては、例えば、酵素活性を指標として染色体遺伝子発現ライブラリーを探索する方法、当該蛋白質に対する抗体を作成して染色体遺伝子発現ライブラリーを探索する方法、精製された蛋白質のN末端等のアミノ酸配列を解析し、これを基にプローブを作成し遺伝子ライブラリーを探索する方法等がある。

具体的には、上記のモルガネラ・モルガニ、エシェリヒア・ブラッカエ、プロビデンシア・スチュアルティ、エンテロバクター・アエロゲネス、クレブシエラ・プランティコラ、セラチア・フィカリア、又はセラチア・マルセセンスの酸性フォスファターゼをコードする遺伝子は、それぞれの微生物の染色体遺伝子発現

ライブラリーを作成し、フォスファターゼ活性を指標として該ライブラリーを探索することによりクローニングできる。

すなわち、まず、上記細菌より染色体DNAを調製し、これを適当な制限酵素で部分分解した後、エシェリヒア・コリで自律複製できるベクターに連結し、得られた組換えDNAを用いてエシェリヒア・コリを形質転換することにより染色体遺伝子発現ライブラリーが作成できる。染色体DNAを切断する際に、切断反応時間等を調節して切断の程度を調整すれば、幅広い種類の制限酵素が使用できる。また、遺伝子のクローニングに使用するベクターとしては、エシェリヒア・コリで自律複製できるベクターであればいかなるものでも構わない。例えば、pUC19、pUC118、pHSG298、pBR322、pBluescriptII等が用いられる。

ベクターと、酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を連結して組換え体DNAを調製するには、染色体DNAを切断するときに用いる制限酵素と同じもの、又は染色体DNA断片の切断面に相補する切断面を生じる制限酵素を用いてあらかじめベクターを切断し、T4DNAリガーゼ等のリガーゼを用いてDNA断片との連結を行えばよい。作成した組換えDNAの受容菌としては、ベクターの複製に好適なものであればいずれの菌株でもよく、例えばHB101、JM109、DH5等のエシェリヒア・コリ菌株が用いられる。

かくして得られる形質転換体を寒天培地上に生育させコロニーを形成させた後、培地表面にp-ニトロフェニル磷酸を含む反応液を注ぎ反応を行うと、フォスファターゼ活性を発現した株は、p-ニトロフェノールを遊離して黄色を示す。前記反応を酸性条件下で行い、呈色を指標として形質転換体を選択することにより、目的の酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を保有する形質転換体を選択することができる。

次いで、選択された形質転換体より組換えDNAを回収し、ベクターに連結されている酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の構造を解析する。酸性フォスファターゼをコードする遺伝子の塩基配列は、モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466由来の遺伝子の場合、配列表配列番号2に、エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650由来の遺伝子の場合、配列表配列番号9に、プロビデンシア・スチュアルティ ATCC 29851由来の遺伝子の場合、配列表配列番号17に、エ

ンテロバクター・アエロゲネス IFO 12010由来の遺伝子の場合、配列表配列番号 19 に、クレブシエラ・プランティコラ IFO 14939由来の遺伝子の場合、配列表配列番号 21 に、セラチア・フィカリア IAM 13540由来の遺伝子の場合、配列表配列番号 23 にそれぞれ示される。

上記遺伝子によりコードされると推定される酸性ホスファターゼのアミノ酸配列を、配列表配列番号 4、11、18、20、22 及び 24 に示す。上記の遺伝子によってコードされる酸性ホスファターゼは、本発明に好適に使用することができる。さらに、上記遺伝子によってコードされる酸性ホスファターゼのアミノ酸配列のいずれかと実質的に相同であるアミノ酸配列を有する酸性ホスファターゼも、本発明に好適に使用することができる。「実質的に相同」とは、酸性ホスファターゼのアミノ酸配列が、ヌクレオシド-5'-リン酸エステル生成活性（以下、「リン酸転移活性」という）を失わないような 1 又は 2 以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転移を含んでいてもよいことを意味する。

< 3 > 変異型酸性フォスファターゼをコードする遺伝子の取得

上記で得られる野生型酸性フォスファターゼは、リン酸エステル加水分解活性を有するため、ヌクレオシド-5'-リン酸エステルの製造においては、反応時間の経過とともに生産物の分解を伴い、反応収率を低下させる要因となることがある。このような場合、リン酸エステル加水分解活性が低下するように酸性フォスファターゼをコードする遺伝子に人為的に変異を起こさせればよい。

DNAの目的部位に目的の変異を起こす部位特異的変異法としては、PCRを用いる方法（Higuchi, R., 61, in PCR technology, Erlich, H. A. Eds., Stockton press (1989)）；Carter, P., Meth. in Enzymol., 154, 382 (1987)）、ファージを用いる方法（Kramer, W. and Frits, H. J., Meth. in Enzymol., 154, 350 (1987)；Kunkel, T. A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367 (1987)）などがある。

リン酸エステル加水分解活性が低下した変異型酸性フォスファターゼの例としては、配列表配列番号 4、11、18、20、22 又は 24 に示されるアミノ酸配列と実質的に相同であるアミノ酸配列を含み、かつ、野生型酸性フォスファター

ぜの磷酸エステル加水分解活性を低下させる変異を有する変異型酸性フォスファターゼが挙げられる。具体的には、モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466由来の酵素の場合、配列表配列番号4に示されるアミノ酸配列において72番目のグリシン残基及び／又は151番目のイソロイシン残基が他のアミノ酸残基に置換したものが挙げられる。後述の実施例では、72番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に、151番目のイソロイシン残基をスレオニン残基に置換した変異型酸性フォスファターゼ遺伝子取得の例を示した。また、エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650由来の酵素の場合、配列表配列番号11に示されるアミノ酸配列において74番目のグリシン残基及び／又は153番目のイソロイシン残基が他のアミノ酸残基に置換したものが挙げられる。後述の実施例では、74番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に、153番目のイソロイシン残基をスレオニン残基に置換した変異型酸性フォスファターゼ遺伝子取得の例を示した。

従って、これらの変異型酸性フォスファターゼをコードするように、上記の部位特異的変異法により、野生型遺伝子の特定の部位において塩基の置換を行えばよい。なお、磷酸エステル加水分解活性を低下させる変異は、野生型酸性フォスファターゼと比較してヌクレオシド-5'-磷酸エステルの生成活性の実質的な低下を伴わない変異であることが望ましく、ヌクレオシド-5'-磷酸エステルの生成活性が低下する場合であっても、磷酸エステル加水分解活性の方が低下の程度が大きく、その結果、磷酸エステル加水分解活性/ヌクレオシド-5'-磷酸生成活性の比が野生型酸性フォスファターゼより低くなるような変異であればよい。磷酸エステル加水分解活性の低下の程度としては、野生型酵素の約40%以下程度まで活性が低下すればよい。

後述の実施例のように、エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650の酸性フォスファターゼのアミノ酸配列は、モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466の酸性フォスファターゼと高い相同性を有しており、配列番号4に示されるアミノ酸配列において72番目のグリシン残基及び151番目のイソロイシン残基は、それぞれ配列番号11に示されるアミノ酸配列における74番目のグリシン残基及び153番目のイソロイシン残基に相当する。また、エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650以外にも、プロビデンシア・スチュアルティ ATCC 29851、エンテロバクター・アエロ

ゲネス IFO 12010、クレブシエラ・プランティコラ IFO 14939及びセラチア・フィカリア IAM 13540等の微生物に由来する酸性フォスファターゼのアミノ酸配列も、モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466の酸性フォスファターゼと相同性が高く、それぞれ配列番号4に示されるアミノ酸配列において72番目のグリシン残基及び151番目のイソロイシン残基に相当するアミノ酸残基を有しており、同様にして変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を得ることができる。配列番号4に示されるアミノ酸配列における72番目のグリシン残基及び151番目のイソロイシン残基に相当するアミノ酸残基は、プロビデンシア・スチュアルティ ATCC 29851、エンテロバクター・アエロゲネス IFO 12010及びクレブシエラ・プランティコラ IFO 14939由来の酸性ホスファターゼでは、配列表配列番号18、20又は22に示すアミノ酸配列において、92番目のグリシン残基及び171番目のイソロイシン残基であり、セラチア・フィカリア IAM 13540由来の酸性ホスファターゼでは、配列表配列番号24に示すアミノ酸配列において、88番目のグリシン残基及び167番目のイソロイシン残基である。

< 4 > 酸性フォスファターゼ遺伝子の宿主への導入

上記のようにして得られる酸性フォスファターゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片は、適当なベクターに再度組換えて宿主細胞に導入させることにより、酸性フォスファターゼ活性を高レベルに発現した組換え菌を得ることができる。その際、野生型酸性ホスファターゼをコードする遺伝子を用いれば、野生型酸性ホスファターゼが、変異型酸性ホスファターゼをコードする遺伝子を用いれば、変異型酸性ホスファターゼが発現される。

宿主としては、上記したHB101、JM109、DH5等のエシェリヒア・コリ菌株が挙げられるが、これ以外にも、構築した組換えDNAの複製起点と酸性フォスファターゼ遺伝子が機能し、組換えDNAが複製可能でかつ酸性フォスファターゼ遺伝子の発現が可能な細菌ならば、すべて宿主として利用できる。最も好ましい宿主の1つはエシェリヒア・コリ JM109である。

酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を組み込むベクターとしては、宿主において複製可能なものであれば特に制限はない。宿主としてエシェリヒア・コ

リを用いる場合には当該細菌で自律複製できるプラスミドを挙げることができる。例えば、ColE1系プラスミド、p15A系プラスミド、R因子系プラスミド、ファージ系プラスミド等を用いることができる。具体的に例示すれば、pBR322 (Gene, 2, 95 (1977))、pUC19 (Gene, 33, 103 (1985))、pUC119 (Methods in Enzymology, 153, 3 (1987))、pACYC184 (J. Bacteriol., 134, 1141 (1978))、pSC101 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 3240 (1973))等が挙げられる。

酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片が、宿主で機能可能なプロモーターを含んでいる場合には、そのままベクターに連結すればよい。前記DNA断片がプロモーターを含まない場合には、前記遺伝子上流に、lac、trp、PL等の宿主微生物内で働く他のプロモーターを連結すればよい。前記DNA断片がプロモーターを含んでいる場合であっても、酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を効率的に発現させるために、他のプロモーターと置換してもよい。

酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとを連結させてなる組換えDNAを宿主に導入する方法としては特に制限はなく、通常の方法により行うことができる。宿主としてエシェリヒア・コリを用いる場合には、塩化カルシウム法 (J. Mol. Biol., 53, 159 (1970))、Hanahan法 (J. Mol. Biol., 166, 557 (1983))、SEM法 (Gene, 96, 23 (1990))、Chungらの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 2172 (1989))、電気穿孔法 (Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988))などの方法を用いることができる。

また、上記のように、酸性フォスファターゼ遺伝子を自律複製可能なベクターDNAに挿入したものを宿主に導入し、染色体外DNAとして宿主に保持させてもよいが、酸性フォスファターゼ遺伝子を、トランスダクション、トランスポゾン (Biotechnol., 1, 417 (1983))、Muファージ (特開平2-109985) または相同組換え (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972)) を用いた方法で宿主微生物の染色体に組み込んでもよい。

< 5 > 組換え菌による酸性フォスファターゼ遺伝子の発現

上記のようにして得られる酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含む組

換えDNAを導入した形質転換体は、炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要ならば有機栄養源を含む適当な培地で培養することにより酸性フォスファターゼ活性を高レベルで菌体内に発現することができる。炭素源としては、グルコース等の炭水化物、グリセロール等のアルコール類、有機酸その他が適宜使用される。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩、その他が用いられる。無機イオンとしては、マグネシウムイオン、磷酸イオン、カリウムイオン、鉄イオン、マンガンイオン、その他が必要に応じ適宜使用される。有機栄養源としては、ビタミン、アミノ酸等及びこれらを含む酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー、カゼイン分解物、大豆加水分解物、その他が適宜用いられる。また、培地にIPTG（イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド）等の、プロモーターに応じた発現誘導剤を添加することにより、酸性フォスファターゼ活性の発現量が上昇する場合がある。

培養条件にも格別の制限はなく、例えば、好氣的条件下にてpH 5～8及び温度25～40℃の範囲内でpH及び温度を適当に制御しつつ12～48時間程度培養を行えばよい。

次いで、培養物から菌体を回収し、破碎により無細胞抽出液を取得し、これから酸性フォスファターゼを精製することができる。精製には上記<1>に述べたような酵素の精製に通常用いられる手法が適宜組み合わせて用いられる。精製は完全精製である必要は必ずしもなく、基質のヌクレオシドの分解に関与する酵素等の夾雑物が除去できればよい。

<6>ヌクレオシド-5'-磷酸エステルの製造

上記<1>で取得した酸性フォスファターゼ又は上記<5>に示したような遺伝子工学的手法により遺伝子を大量発現させて得られる野生型酸性フォスファターゼもしくは変異型酸性フォスファターゼを、ヌクレオシド並びにポリ磷酸（塩）、フェニル磷酸（塩）及びカルバミル磷酸（塩）よりなる群より選択された磷酸供与体に接触反応させることにより、反応液中にヌクレオシド-5'-磷酸エステルを生成することができる。この際、高い生産性を得るには、反応液のpHを3.0～5.5の範囲の弱酸性に調製することが重要である。

また、遺伝子工学的手法により酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を大量発現させた場合、特に、磷酸エステル加水分解活性が低下した変異型酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を大量発現させた場合には、精製した酸性フォスファターゼに替えて、形質転換体の菌体を含む培養物、該培養物から分離・回収した菌体、該菌体を固定化处理、アセトン処理、凍結乾燥処理等した菌体処理物を使用することによっても、安価かつ効率的にヌクレオシド-5'-磷酸エステルを生成することができる。

使用するヌクレオシドとしては、プリンヌクレオシド類として、イノシン、グアノシン、アデノシン、キサンチン、プリンリボシド、6-メトキシプリンリボシド、2, 6-ジアミノプリンリボシド、6-フルオロプリンリボシド、6-チオプリンリボシド、2-アミノ-6-チオプリンリボシド、メルカプトグアノシン等、ピリミジンヌクレオシド類として、ウリジン、シチジン、5-アミノウリジン、5-ヒドロキシウリジン、5-ブロモウリジン、6-アザウリジン等が挙げられる。反応によりこれらの天然型ヌクレオシド及び非天然型ヌクレオシドの5'位が特異的に磷酸化され、それぞれ対応するヌクレオシド-5'-磷酸エステルが生成する。

反応液に添加するヌクレオシドの濃度は1~20g/dlが望ましい。水に難溶性のヌクレオシドを使用する場合には、硼酸あるいはジメチルスルホキシドのような界面活性剤を添加すると反応収率が向上する場合がある。

磷酸供与体として用いられるポリ磷酸(塩)としては、ピロ磷酸、トリポリ磷酸、トリメタ磷酸、テトラメタ磷酸、ヘキサメタ磷酸もしくはそれらの混合物、又はそれらのナトリウム塩、カリウム塩もしくはそれらの塩混合物などが、フェニル磷酸(塩)としては、フェニル磷酸ジナトリウム、フェニル磷酸ジカリウム、O, O'-ジフェニル磷酸無水物もしくはそれらの混合物などが、カルバミル磷酸(塩)としては、カルバミル磷酸ジナトリウム、カルバミル磷酸ジカリウム、カルバミル磷酸ジアンモニウム、カルバミル磷酸ジリチウムもしくはそれらの混合物などが使用可能である。磷酸供与体の使用濃度は、磷酸受容体であるヌクレオシドの濃度によって決定される。通常、ヌクレオシドの1~5倍量が望ましい。

反応は通常、温度20~60℃、好ましくは30~40℃で、pH3.5~6.5、好ましくは

pH4.0～5.0の弱酸性側が好結果を与える。反応には静置又は攪はんのいずれの方法も採用し得る。反応時間は、使用する酵素の活性、基質濃度などの条件によって異なるが、1～100時間である。

このようにして生成したヌクレオシド-5'-リン酸エステルを反応終了混合物より採取分離するには、合成吸着樹脂を用いる方法や沈殿剤を用いる方法、その他通常の採取分離方法が採用できる。

図面の簡単な説明

図1は、モルガネラ・モルガニ由来の酵素を用いた反応において反応pHと5'-イノシン酸生成量との関係を示す図である。

図2は、エシェリヒア・ブラッタエ由来の酵素を用いた反応において反応pHと5'-イノシン酸生成量との関係を示す図である。

図3は、酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むモルガネラ・モルガニの染色体DNA断片の制限酵素地図を示す図である。

図4は、モルガネラ・モルガニ由来の酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた反応における5'-イノシン酸の生産量を示す図である。

図5は、モルガネラ・モルガニ由来の野生型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株及び変異型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた反応における5'-イノシン酸の生産量を示す図である。

図6は、酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むエシェリヒア・ブラッタエの染色体DNA断片の制限酵素地図を示す図である。

図7は、エシェリヒア・ブラッタエ由来の酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた反応における5'-イノシン酸の生産量を示す図である。

図8は、エシェリヒア・ブラッタエ由来の野生型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株及び変異型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた反応における5'-イノシン酸の生産量を示す図である。

図9は、酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むエンテロバクター・アエロゲネスの染色体DNA断片の制限酵素地図を示す図である。

図10は、酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むクレブシエラ・プランティコラの染色体DNA断片の制限酵素地図を示す図である。

図11は、酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むセラチア・フィカリアの染色体DNA断片の制限酵素地図を示す図である。

図12は、モルガネラ・モルガニ、エシェリヒア・ブラッタエ、プロビデンス・スチュアルティ、エンテロバクター・アエロゲネス、クレブシエラ・プランティコラ及びセラチア・フィカリアの酸性フォスファターゼ遺伝子の塩基配列より予想される蛋白質のアミノ酸配列をアミノ酸の一文字表記で示した図である。これらのアミノ酸配列は、各々配列表配列番号4、11、18、20、22及び24に3文字表記で示されている。図中ですべてのアミノ酸配列において共通のアミノ酸残基を配列の下に*で示した。

好適な実施例の説明

以下、実施例にて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

磷酸転移活性の測定は、イノシンを基質として次の条件で行った。イノシン40 $\mu\text{mol/ml}$ 、ピロ磷酸ナトリウム100 $\mu\text{mol/ml}$ 、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 10 $\mu\text{mol/ml}$ 及び酵素を含む反応液 (1ml) でpH5.0、30°Cで10分反応を行った。2N塩酸200 μl を添加して反応を停止した後、遠心分離により沈澱を除き、磷酸転移反応により生成した5'-イノシン酸を定量した。この標準反応条件にて1分間に1 μmol の5'-イノシン酸を生成する酵素量を1 unitと定めた。

また、磷酸エステル加水分解活性の測定は、5'-イノシン酸を基質として次の条件で行った。5'-イノシン酸10 $\mu\text{mol/ml}$ 、メス/NaOH緩衝液 (pH6.0) 100 $\mu\text{mol/ml}$ 及び酵素を含む反応液 (1ml) で30°Cで10分反応を行った。2N塩酸20 μl を添加して反応を停止した後、遠心分離により沈澱を除き、加水分解反応により生成したイノシンを定量した。この標準反応条件にて1分間に1 μmol のイノシンを生成する酵素量を1 unitと定めた。

なお、イノシン及び5'-イノシン酸は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

LC) により、下記の条件にて分析した。

カラム : Cosmosil 5C18-AR (4.6×150mm) [ナカライテスク社製品]

移動相 : 5mM 磷酸カリウムバッファー (pH 2.8) / メタノール = 95/5

流速 : 1.0ml/min

温度 : 室温

検出 : UV245nm

また、イノシン以外のヌクレオシドを原料とするヌクレオシド-5'-磷酸エステルの生成反応においても、原料のヌクレオシド及び生成したヌクレオシド-5'-磷酸エステルは、上記と同様にHPLCにより分析した。

実施例1 モルガネラ・モルガニ由来の酸性フォスファターゼの精製と性質

ペプトン 1 g/dl、酵母エキス 0.5 g/dl 及び食塩 1 g/dl を含有する栄養培地 (pH7.0) 50ml を 500ml 坂口フラスコに入れ、120℃にて20分間加熱殺菌した。これに、斜面培養したモルガネラ・モルガニ NCIMB 10466 を一白金耳接種し、30℃で16時間振盪培養した。培養液から遠心分離により回収した菌体約 3,000g を 1 L の 100mM 磷酸カリウムバッファー (pH7.0) に懸濁し、4℃で20分間超音波処理を行い菌体を破碎した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。

この無細胞抽出液に30%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加した。遠心分離により生成した沈澱を除去した後、上清液に60%飽和となるように硫酸アンモニウムを追加添加した。生成した沈澱を遠心分離で集め、100mM 磷酸カリウムバッファーに溶解した。

この粗酵素液を100mM 磷酸カリウムバッファー (pH7.0) 5 L に対し4回透析した後、20mM 磷酸カリウムバッファー (pH7.0) で平衡化したDEAE-トヨパール 650 Mカラム (φ4.1×22cm) にチャージし、800ml の20mM 磷酸カリウムバッファー (pH7.0) で洗浄した。磷酸転移活性は、素通り画分にあったので、当該画分を回収した。

この活性画分に、35%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加し、35%硫酸

飽和の20mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) で平衡化したブチルトヨパールカラム ($\phi 3.1 \times 26\text{cm}$) に吸着させた。35%飽和から20%飽和磷酸カリウムバッファー (pH7.0) の直線的な濃度勾配で溶出した。

活性画分を集め、50mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) 1 L に対し透析した後、50mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム ($\phi 5 \times 6.5\text{cm}$) に吸着させた。50mMから300mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) の直線的な濃度勾配で溶出した。

活性画分を集め、限外ろ過により濃縮した。この酵素液をHiLoad T M 16/60 Superdex200カラム (ファルマシア社製品) に注入し、100mM食塩を含む50mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0)、流速1.0ml/分にて溶出した。

以上の操作によって、磷酸転移活性を示す酵素を無細胞抽出液より最終的に約10%の回収率で約550倍に精製した。この精製過程における比活性及び回収率を表1に示す。この酵素標品は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動において均一であった。

表 1

工程	総活性 (unit)	総蛋白 (mg)	比活性 (unit/mg)	回収率 (%)
1. 無細胞抽出液	597	127,200	0.005	100
2. 硫酸分画 (30~60%)	568	122,210	0.005	95
3. DEAE-トヨパール	517	36,498	0.014	87
4. ブチルトヨパール	394	1,121	0.351	66
5. ヒドロキシアパタイト	112	50	2.244	19
6. Superdex200	63	24	2.630	10

精製された酵素は次の性質を有していた。

(1) 作用: ポリ磷酸等の磷酸供与体よりヌクレオシドに磷酸を転移し、ヌクレオシド-5'-磷酸エステルを生成する。逆に磷酸エステルを加水分解する作用も示す。

(2) 基質特異性: 磷酸転移反応においてはピロ磷酸、トリポリ磷酸、トリメタ

磷酸、テトラメタ磷酸、ヘキサメタ磷酸、フェニル磷酸ジナトリウム、フェニル磷酸ジカリウム、O, O-ジフェニル酸無水物、カルバミル磷酸ジナトリウム、カルバミル磷酸ジカリウム、カルバミル磷酸ジアンモニウム、カルバミル磷酸ジリチウムなどが磷酸供与体となる。また、磷酸受容体としてはプリンリボシド、イノシン、グアノシン、アデノシン、ギサントシン、ウリジン、シチジン等が磷酸受容体となる。一方、磷酸エステル加水分解反応においては、ピロ磷酸、トリポリ磷酸、トリメタ磷酸、テトラメタ磷酸、ヘキサメタ磷酸等の無機磷酸、また、フェニル磷酸ジナトリウム、フェニル磷酸ジカリウム、O, O-ジフェニル磷酸無水物、カルバミル磷酸ジナトリウム、カルバミル磷酸ジカリウム、カルバミル磷酸ジアンモニウム、カルバミル磷酸ジリチウム等の磷酸エステル、さらに、5'-プリンリボチド、5'-イノシン酸、5'-グアニル酸、5'-アデニル酸、5'-キサンチル酸、5'-ウリジル酸、5'-シチジル酸等の5'-ヌクレオチドが作用を受ける。

(3) 至適pH: 5.2 (磷酸転移反応)、6.5 (磷酸エステル加水分解反応)

(4) pH安定性: pH3.0~12.0 (30℃、60分処理)

(5) 至適温度: 35℃付近

(6) 温度安定性: 30℃まで安定 (pH7.0、30分処理)

(7) 金属イオン及び阻害剤の影響: 本酵素活性は金属イオン添加による活性化現象は見られず、 Ag^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 及び Cu^{2+} によって阻害される。また、ヨード酢酸によって阻害される。

(8) 分子量: 高速液体クロマトグラフィー (TSKgel G-3000SW、東ソー社製品) により約190,000と算出される。

(9) サブユニット分子量: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約25,000と算出される。

本酵素はヌクレオシドへの磷酸転移活性だけでなく、逆に磷酸エステルを加水分解する活性も示し、しかも磷酸エステル分解活性のほうが磷酸転移活性に比べて20倍以上高い活性を示した。また、その他の性質もモルガネラ属の菌が産生する既知の酸性フォスファターゼとよく一致することから (Microbiology, 140, 1

341-1350 (1994))、本酵素は酸性フォスファターゼであることが明らかとなった。

ピロリン酸ナトリウム10g/dl及びイノシン2g/dlをpH5.5、5.0、4.5、4.0、3.5の各pHの酢酸ナトリウムバッファーに溶解し、これに上記の酵素標品を50units/dlとなるように添加した。各pHを維持しながら30℃で6時間反応を行い、経時的に生成した5'-イノシン酸の量を測定した。なお、生成したイノシン酸は、5'-イノシン酸のみで、2'-イノシン酸及び3'-イノシン酸の副生は全く認められなかった。結果を図1に示す。5'-イノシン酸の生成速度はpH5.0の時に最大となったが、5'-イノシン酸の最大蓄積量はpHがより低い方が高くなった。5'-イノシン酸の生産にはpH4.0の反応条件が最も効率がよく、3時間の反応で2.60g/dlの5'-イノシン酸が生成蓄積した。

実施例2 モルガネラ・モルガニ由来の酸性フォスファターゼ標品による 種々のヌクレオシドのリン酸化反応

ピロリン酸ナトリウム10g/dl及びリン酸受容体としてイノシン、グアノシン、ウリジン又はシチジンを2g/dlを酢酸ナトリウムバッファー(pH4.0)に溶解し、これに実施例1の酵素標品を50units/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、30℃で3時間反応させた。反応により生成したヌクレオシド-5'-エステルの量を表2に示す。

なお、生成したヌクレオチドはヌクレオシド-5'-エステルのみでヌクレオシド-2'-エステル及びヌクレオシド-3'-エステルの副生は全く認められなかった。

表2

ヌクレオシド	生成物	生成量 (g/dl)
イノシン	5'-イノシン酸	2.60
グアノシン	5'-グアニル酸	1.90
ウリジン	5'-ウリジル酸	1.30
シチジン	5'-シチジル酸	0.98

実施例 3 モルガネラ・モルガニ由来の酸性フォスファターゼ標品による
種々の磷酸化合物を磷酸供与体とする 5' - イノシン酸の生産

イノシン 2 g/dl 及び磷酸供与体としてトリポリ磷酸ナトリウム、ポリ磷酸ナトリウム（商品名：ポリゴン P、千代田化学（株）製品）、フェニル磷酸ジナトリウム又はカルバミル磷酸ジナトリウム 10 g/dl を酢酸ナトリウムバッファー（pH 4.0）に溶解し、これに実施例 1 で調製した酵素標品を 50 units/dl となるように添加し、pH を 4.0 に維持しながら 30℃ で 3 時間反応させた。反応により生成した 5' - イノシン酸の量を表 3 に示す。

いずれの磷酸供与体を用いた場合にも効率よく 5' - イノシン酸が生成蓄積したが、ポリ磷酸ナトリウムを磷酸供与体として用いた場合に最も 5' - イノシン酸の蓄積量が高かった。

表 3

磷酸供与体	生成 5' - イノシン酸 (g/dl)
トリポリ磷酸ナトリウム	2.10
ポリ磷酸ナトリウム	2.72
フェニル磷酸ジナトリウム	2.33
カルバミル磷酸ジナトリウム	2.54

実施例 4 エシェリヒア・ブラッタエ由来の酸性フォスファターゼの精製と性質

ペプトン 1 g/dl、酵母エキス 0.5 g/dl 及び食塩 1 g/dl を含有する栄養培地（pH 7.0）50 ml を 500 ml 坂口フラスコに入れ、120℃ にて 20 分間加熱殺菌した。これに、斜面培養したエシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650 を一白金耳接種し、30℃ で 16 時間振盪培養した。培養液から遠心分離により菌体を回収した。この菌体約 3,300 g を 1 L の 100 mM 磷酸カリウムバッファー（pH 7.0）に懸濁し、4℃ で 20 分間超音波処理を行い菌体を破碎した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出

液を調製した。

この無細胞抽出液に30%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加した。遠心分離により生成した沈澱を除去した後、上清液に60%飽和となるように硫酸アンモニウムを追加添加した。生成した沈澱を遠心分離により回収し、100mM磷酸カリウムバッファーに溶解した。

この粗酵素液を100mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) 5 Lに対し4回透析した後、20mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) で平衡化したDEAE-トヨパール650Mカラム (φ6.2×35cm) にチャージし、20mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) で洗浄した。磷酸転移活性は素通り画分にあったので、当該画分を回収した。

この活性画分に35%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加し、これを35%飽和硫酸アンモニウムを含む20mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) で平衡化したブチルトヨパールカラム (φ5.0×22.5cm) に吸着させた。これを35%飽和から20%飽和磷酸カリウムバッファー (pH7.0) の直線的な濃度勾配で溶出した。

活性画分を集め、100mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) 1 Lに対し透析した後、100mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム (φ3.0×7.0cm) に吸着させた。これを50mMから100mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) の直線的な濃度勾配で溶出し、活性画分を集めた。

この酵素液を10mM磷酸カリウムバッファー (pH6.0) 1 Lに対し透析した後、10mM磷酸カリウムバッファー (pH6.0) で平衡化したCM-Toyopearlカラム (φ2.0×14.0cm) に吸着させた。これを0mMから300mM 塩化カリウムを含む磷酸カリウムバッファー (pH6.0) の直線的な濃度勾配で溶出した。この活性画分を集めた。

以上の操作によって、磷酸転移活性を示す酵素を無細胞抽出液より最終的に約16%の回収率で約600倍に精製した。この精製過程における比活性及び回収率を表4に示す。この酵素標品は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動において均一であった。

表 4

工程	総活性 (unit)	総蛋白 (mg)	比活性 (unit/mg)	回収率 (%)
1. 無細胞抽出液	365	160,650	0.002	100
2. 硫酸分画 (30~60%)	340	138,895	0.002	93
3. DEAE-トヨパール	318	30,440	0.010	87
4. ブチルトヨパール	232	661	0.347	63
5. ヒドロキシアパタイト	96	96	1.000	26
6. CM-Toyopearl	59	43	1.365	16

精製された酵素は次の性質を有していた。

(1) 作用：ポリリン酸等のリン酸供与体よりヌクレオシドにリン酸を転移し、ヌクレオシド-5'-リン酸エステルを生成する。逆にリン酸エステルを加水分解する作用も示す。

(2) 基質特異性：リン酸転移反応においてはピロリン酸、トリポリリン酸、トリメタリン酸、テトラメタリン酸、ヘキサメタリン酸、フェニルリン酸ジナトリウム、フェニルリン酸ジカリウム、O, O-ジフェニルリン酸無水物、カルバミルリン酸ジナトリウム、カルバミルリン酸ジカリウム、カルバミルリン酸ジアンモニウム、カルバミルリン酸ジリチウムなどがリン酸供与体となる。またリン酸受容体としてはプリンリボシド、イノシン、グアノシン、アデノシン、キサンチン、ウリジン、シチジン等がリン酸受容体となる。一方、リン酸エステル加水分解反応においては、ピロリン酸、トリポリリン酸、トリメタリン酸、テトラメタリン酸、ヘキサメタリン酸等の無機リン酸、また、フェニルリン酸ジナトリウム、フェニルリン酸ジカリウム、O, O-ジフェニルリン酸無水物、カルバミルリン酸ジナトリウム、カルバミルリン酸ジカリウム、カルバミルリン酸ジアンモニウム、カルバミルリン酸ジリチウム等のリン酸エステル、そして5'-プリンリボチド、5'-イノシン酸、5'-グアニル酸、5'-アデニル酸、5'-キサンチル酸、5'-ウリジル酸、5'-シチジル酸等の5'-ヌクレオチドが作用を受ける。

(3) 至適pH：5.2（リン酸転移反応）、6.5（リン酸エステル加水分解反応）

(4) pH安定性：pH3.5~12.0（30℃、60分処理）

- (5) 至適温度：35℃付近
- (6) 温度安定性：40℃まで安定 (pH7.0、30分処理)
- (7) 金属イオン及び阻害剤の影響：本酵素活性は金属イオン添加による活性化現象は見られず、 Fe^{2+} 、 Ag^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 及び Cu^{2+} によって阻害される。また、ヨード酢酸によって阻害される。
- (8) 分子量：高速液体クロマトグラフィー (TSKgel G-3000SW、東ソー社製品) により約188,000と算出される。
- (9) サブユニット分子量：SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約24,500と算出される。

本酵素もモルガネラ・モルガニ NCIMB 10466の無細胞抽出液より精製した酵素と同様にヌクレオシドへの磷酸転移活性だけでなく、逆に磷酸エステルを加水分解する活性も示した。しかも磷酸エステル分解活性のほうが磷酸転移活性に比べて30倍以上高い活性を示すことから、酸性フォスファターゼであることが明らかとなった。

ピロ磷酸ナトリウム15g/dl及びイノシン 3 g/dlをpH5.5、5.0、4.5、4.0、3.5の各pHの酢酸ナトリウムバッファーに溶解し、これに上記の酵素標品を50units/dlとなるように添加した。各pHを維持しながら30℃で6時間反応を行い、経時的に生成した5'-イノシン酸の量を測定した。なお、生成したイノシン酸は5'-イノシン酸のみで、2'-イノシン酸及び3'-イノシン酸の副生は全く認められなかった。結果を図2に示す。5'-イノシン酸の生成速度はpH5.0の時に最大となったが、5'-イノシン酸の最大蓄積量はpHがより低い範囲の方が高く、5'-イノシン酸の生産はpH4.0の反応条件が最も効率的であった。30℃、pH4.0の反応では3時間で1.56g/dlの5'-イノシン酸が生成蓄積した。

実施例5 エシェリヒア・ブラッカエ由来の酸性フォスファターゼ標品による 種々のヌクレオシドの磷酸化反応

ピロ磷酸ナトリウム15g/dl及びイノシン、グアノシン、ウリジン又はシチジンを3 g/dlを酢酸ナトリウムバッファー (pH4.0) に溶解し、これに実施例4の酵素

標品を50units/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、35℃で3時間反応させた。生成したヌクレオシド-5'-エステルを量を表5に示す。

なお、生成したヌクレオチドはヌクレオシド-5'-エステルのみでヌクレオシド-2'-エステル及びヌクレオシド-3'-エステルの副生は全く認められなかった。

表5

ヌクレオシド	生成物	生成量 (g/dl)
イノシン	5'-イノシン酸	1.56
グアノシン	5'-グアニル酸	1.05
ウリジン	5'-ウリジル酸	1.87
シトシン	5'-シチジル酸	1.22

実施例6 エシェリヒア・ブラッカエ由来の酸性フォスファターゼ標品による 種々の磷酸化合物を磷酸供与体とする5'-イノシン酸の生産

イノシン2g/dl及び磷酸供与体としてトリポリ磷酸ナトリウム、ポリ磷酸ナトリウム（商品名：ポリゴンP、千代田化学（株）製品）、フェニル磷酸ジナトリウム又はカルバミル磷酸ジナトリウム10g/dlを酢酸ナトリウムバッファー（pH4.0）に溶解し、これに実施例4で調製した酵素標品を上記の酵素標品を50units/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、35℃で3時間反応させた。生成した5'-イノシン酸の量を表6に示す。

いずれの磷酸供与体を用いた場合にも効率よく5'-イノシン酸が生成蓄積したが、ポリ磷酸ナトリウムを磷酸供与体として用いた場合に最も5'-イノシン酸の蓄積量が高かった。

表 6

磷酸供与体	生成 5' - イノシン酸 (g/dl)
トリポリ磷酸ナトリウム	1.20
ポリ磷酸ナトリウム	1.79
フェニル磷酸ジナトリウム	1.50
カルバミル磷酸ジナトリウム	1.53

実施例 7 モルガネラ・モルガニ染色体からの酸性フォスファターゼを
コードする遺伝子の単離

(1) N末端アミノ酸配列の決定

モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466の無細胞抽出液から実施例 1 記載の方法に従い精製した酸性フォスファターゼをD I T Cメンブレン (Milligen/Bioscience社製) に吸着させ、Prosequencer 6625 (Milligen/Bioscience社製) を用いてN末端のアミノ酸配列を決定した。配列表配列番号 1 に示した20残基のN末端アミノ酸配列が決定された。

(2) 酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の単離

モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466の培養菌体からMurray and Thomsonの方法 (Nucl. Acid Res., 4321, 8 (1980)) に従い、染色体DNAを調製した。これを制限酵素 S a u 3 A I で部分分解した後、ショ糖密度勾配遠心分離により3~6 kbpのDNA断片を分画した。プラスミドベクターpUC118 (宝酒造社製) を制限酵素 B a m H I で切断し、部分分解した染色体DNA断片と連結させた。DNAの連結はDNAライゲーションキット (宝酒造社製) を用い、指定された方法にて行った。次いで、得られたDNA混合物を用いて常法によりエシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造社製) を形質転換した。形質転換体をアンピシリン100 μ g/mlを含む寒天培地上にプレーティングして生育させ、遺伝子ライブラリーを作成した。

形質転換体の生育した寒天培地の表面に4 mM p - ニトロフェニル磷酸及び100 mM メスノ NaOHバッファー (pH6.5) を含む反応液を注ぎ、30℃で15分間保温した。フォスファターゼ活性を発現した菌は、p - ニトロフェノールを遊離して

黄色を示すため、これを指標として形質転換体を選択した。約20,000株の形質転換体の遺伝子発現ライブラリーを探索した結果、フォスファターゼ活性を発現した形質転換体30株が得られた。

フォスファターゼ活性を発現した30株の形質転換体を単コロニー分離し、アンピシリン100 μ g/mlを含むL培地2.5mlに接種し、37℃で16時間培養した。培養液より集菌した菌体にイノシン2g/dl及びピロリン酸ナトリウム10g/dlを含む100mM酢酸ナトリウムバッファー (pH5.0) 50 μ lを添加し、30℃で16時間反応を行った。HPLC分析にて5'-イノシン酸の生成を検出し、リン酸転移活性を持つ菌株を選択した。その結果、リン酸転移活性を示し、目的の酸性フォスファターゼ遺伝子を含むDNA断片を保有すると予想される形質転換体5株を得ることができた。

実施例8 モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466由来の

酸性フォスファターゼ遺伝子の塩基配列の決定

実施例7で得られたモルガネラ・モルガニ NCIMB10466由来酸性フォスファターゼ遺伝子を含むDNA断片を保有すると予想される形質転換体の1株より、アルカリ溶菌法 (Molecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, pl. 25 (1989))) によりプラスミドを調製し、挿入されたDNA断片の解析を行った。なお、このプラスミドをpMPI501と命名した。決定した挿入DNA断片の制限酵素地図を図3に示す。

さらにサブクローニングにより、酸性フォスファターゼ遺伝子領域を限定した結果、制限酵素Hind IIIと制限酵素EcoRIで切り出される1.2Kbpの大きさの断片中に本酸性フォスファターゼ遺伝子が含まれることが示唆された。そこで塩基配列の決定のために、この1.2kbpの断片をHind III及びEcoRIで切断したpUC118に結合したプラスミドDNAを構築した。pMPI505と命名したこのプラスミドDNAを用いて常法によりエシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造 (社) 製) を形質転換し、これを100 μ g/mlのアンピシリンを含むL寒天培地上にプレーティングし、形質転換体を得た。

pMPI505を保有するエシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造製) の形質転換体よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定は、Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオケミカル社製) を用い、サンガーらの方法 (J. Mol. Biol., 143, 161 (1980)) に従って行った。決定したオープン・リーディング・フレームの塩基配列を配列表配列番号 2 に示した。また、この塩基配列より推定される蛋白質のアミノ酸配列を配列表配列番号 3 に示した。このアミノ酸配列中に精製酵素の N 末端アミノ酸配列と完全に一致する配列が存在した。精製酵素の N 末端は配列番号 3 に示される配列の 21 番目のアラニン残基から開始していたため、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列は前駆体蛋白質の配列であり、1 番目のメチオニン残基から 20 番目のアラニン残基までのペプチドは翻訳後に除去されるものと考えられた。これより推定される成熟蛋白質のアミノ酸配列を配列表配列番号 4 に示した。アミノ酸配列から予想される成熟蛋白質の分子量は 24.9 キロダルトンと算出され、精製酵素の SDS-PAGE の結果とよく一致した。以上の結果及び本断片を含むプラスミドを有する形質転換体が磷酸転移活性を示すことから本オープン・リーディング・フレームは目的の酸性フォスファターゼをコードする領域であると同定した。

塩基配列、アミノ酸配列各々について既知の配列との相同性比較を行った。用いたデータベースは EMBL 及び SWISS-PROT である。その結果、配列表配列番号 2 に示される塩基配列は、既知のモルガネラ・モルガニ由来の酸性フォスファターゼ遺伝子 (Thaller, M. C. et. al. Microbiology, 140, 1341 (1994)) では、54 番目の G が A、72 番目の G が A、276 番目の T が G、378 番目の T が C、420 番目の G が T、525 番目の C が G、529 番目の C が T、531 番目の G が A である以外は配列が一致し、また、配列表配列番号 4 に示されるアミノ酸配列は、モルガネラ・モルガニ由来の酸性フォスファターゼと同一であることが判明した。すなわち、配列表配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする遺伝子が、モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466 の酸性フォスファターゼ遺伝子である。

なお、前駆体蛋白質は 249 個のアミノ酸から成り、その配列から予想される蛋白質の分子量は 27.0 キロダルトンであった。

また、pMPI505をエシェリヒア・コリ JM 109に保持させた株は、AJ13143と命名され、平成8年2月23日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）にブタペスト条約に基づき国際寄託され、受託番号FERM BP-5422が付与されている。

実施例9 モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466由来の酸性フォスファターゼ
遺伝子の発現による活性の増幅

実施例8にて構築したエシェリヒア・コリ JM109/pMPI505をアンピシリン100 μ g/ml及びIPTG 1mMを含むL培地50mlに接種し、37℃で16時間培養した。該培養液から遠心分離により菌体を集め、生理食塩水で1回洗浄した。菌体を5mlの100mM磷酸カリウムバッファー（pH7.0）に懸濁し、4℃で20分間超音波処理を行い破碎した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。

得られた無細胞抽出液の磷酸転移活性を、プラスミドpUC118で同様に形質転換したエシェリヒア・コリ JM109及びモルガネラ・モルガニ野生株より調製した無細胞抽出液の活性を対照として測定した結果を表7に示した。エシェリヒア・コリ JM109/pUC118では磷酸転移活性は検出されず、モルガネラ・モルガニ野生株でも磷酸転移活性は低かった。一方、エシェリヒア・コリ JM109/pMPI505はモルガネラ・モルガニ野生株に比べて比活性で150倍と高い磷酸転移活性を示しており、この結果から導入したDNA断片がエシェリヒア・コリにおいて酸性フォスファターゼを高発現していることが示された。

表7

菌 株	磷酸転移活性(units/mg)
モルガネラ・モルガニ NCIMB10466	0.008
エシェリヒア・コリ JM109/pUC118	検出せず
エシェリヒア・コリ JM109/pMPI505	1.250

実施例 10 モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466由来の酸性フォスファターゼ
遺伝子保持株を用いたイノシンから5' -イノシン酸の生産

ピロリン酸ナトリウム12g/dl及びイノシン6g/dlを100mM酢酸ナトリウムバッファー (pH4.0) に溶解し、これに上記のエシェリヒア・コリ JM109/pMPI505の菌体を乾燥菌体重量で100mg/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、30℃で6時間反応を行い、経時的に生成した5' -イノシン酸の量を測定した。なお、生成したイノシン酸は5' -イノシン酸のみで2' -イノシン酸及び3' -イノシン酸の副生は全く認められなかった。結果を図4に示す。酸性フォスファターゼ遺伝子保持株は著量の酸性フォスファターゼを発現し、本菌を用いたピロリン酸とイノシンからの5' -イノシン酸生産反応においては、非常に効率よく短時間で5' -イノシン酸が生成蓄積した。しかし、反応時間をのばすと生成蓄積した5' -イノシン酸の分解による減少が認められた。

実施例 11 磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼ
遺伝子の作成

実施例9及び10に示したように酸性フォスファターゼ遺伝子保持株は著量の酸性フォスファターゼを発現し、本菌を用いたピロリン酸とイノシンからの5' -イノシン酸生産反応においては、非常に効率よく短時間で5' -イノシン酸が生成蓄積する。しかし、生成した5' -イノシン酸が酸性フォスファターゼ自体が有する磷酸エステル加水分解活性によって分解を受けるために5' -イノシン酸の蓄積量がある程度以上は上がらないことが判明した。そこで実施例7にてクローニングしたモルガネラ・モルガニ NCIMB 10466由来酸性フォスファターゼ遺伝子にPCRを用いる部位特異的変異法により変異を導入し、酵素の改質を行った。

DNA合成装置(アプライドバイオシステム社製モデル394)を用いてホスホアミダイト法にて配列表配列番号5、6及び7に示す配列を有するオリゴヌクレオチドMUT500、MUT510及びMUT520をそれぞれ合成した

鋳型として実施例8で調製したプラスミドpMPI505 1ng、プライマーとしてM13プライマーRV(宝酒造社製)とMUT510オリゴヌクレオチド各2.5μmol及びタ

ックDNAポリメラーゼ（宝酒造社製）2.5ユニットをdATP、dCTP、dGTP、dTTP各200 μ M、塩化カリウム 50mM及び塩化マグネシウム 1.5mMを含む100mM トリスー塩酸緩衝液（pH8.3）100 μ lに添加し、94℃を30秒、55℃を2分、72℃を3分のサイクルを25回繰り返すPCR反応を行った。PCR反応はサーマルサイクラーPJ2000型（宝酒造社製）を用いて行った。また別に、鋳型としてプラスミドDNA pMPI505 1ng、プライマーとしてM13プライマー-M4（宝酒造社製）とMUT500オリゴヌクレオチド各2.5 μ molを用いて同様にPCR反応を行った。それぞれの反応液をマイクロスピンカラムS-400（ファルマシア社製）を用いてゲル濾過により精製し、プライマーを除去した。

それぞれのPCR反応液1 μ lをdATP、dCTP、dGTP、dTTP各200 μ M、塩化カリウム 50mM及び塩化マグネシウム 1.5mMを含む100mM トリスー塩酸緩衝液（pH8.3）95 μ lに添加し、94℃で10分加熱後、60分間かけて37℃まで冷却した後、37℃で15分保温しヘテロ二本鎖を形成させた。これにタックDNAポリメラーゼ2.5ユニットを添加して72℃で3分反応を行い、ヘテロ二本鎖を完成させた。次に、この反応液にM13プライマー-RV及びM13プライマー-M4各2.5 μ molを添加して、94℃を30秒、55℃を2分、72℃を3分のサイクルを10回繰り返すPCR反応を行った。

2回目のPCR反応の生成物をHindIIIとEcoRIで切断後フェノール／クロロホルム抽出し、エタノール沈殿した。このDNA断片をHindIII及びEcoRIで切断したpUC118に結合し、得られたプラスミドDNAを用いて常法によりエシェリヒア・コリ JM109（宝酒造製）を形質転換した。これを100 μ g/mlのアンプシリンを含むL寒天培地上にプレーティングし、形質転換体を得た。形質転換体よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、塩基配列の決定を行い、目的の塩基が置換されていることを確認した。塩基配列の決定はTaq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオケミカル社製）を用い、サンガーらの方法（J. Mol. Biol., 143, 161（1980））に従って行った。このようにして成熟蛋白質の72番目のグリシン残基（GGT）がアスパラギン酸残基（G*AT）に置換した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子を作成した。この変異型遺伝子を含むプラスミドをpMPI510と命名した。

また、鋳型としてpMPI505、プライマーとしてMUT500とMUT520オリゴヌクレオチド

ドを用いて同様の操作により、成熟蛋白質の151番目のイソロイシン残基（ATC）がスレオニン残基（A*CC）に置換した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子を作成した。この変異型遺伝子を含むプラスミドをpMPI520と命名した。さらに鋳型としてpMPI510、プライマーとしてMUT500とMUT520オリゴヌクレオチドを用いて同様の操作により、成熟蛋白質の72番目のグリシン残基（GGT）がアスパラギン酸残基（G*AT）に、151番目のイソロイシン残基（ATC）がスレオニン残基（A*CC）に置換した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子を作成した。この変異型遺伝子を含むプラスミドをpMPI530と命名した。

それぞれの変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pMPI510、エシェリヒア・コリ JM109/pMPI520、エシェリヒア・コリ JM109/pMPI530及び野生型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pMPI505をアンピシリン100 µg/ml及びIPTG 1 mMを含むL培地50mlに接種し、37℃で16時間培養した。該培養液から遠心分離により菌体を集め、生理食塩水で1回洗浄した。菌体を5 mlの100 mM磷酸カリウムバッファー（pH7.0）に懸濁し、4℃で20分間超音波処理を行い菌体を破碎した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。得られた無細胞抽出液の磷酸エステル加水分解活性及び磷酸転移活性をpH 4.0にて測定し、野生株のものと比較した。

野生型および変異型酸性フォスファターゼの磷酸エステル加水分解活性及び磷酸転移活性を測定した結果を表8に示す。変異型酸性フォスファターゼは、野生型酸性フォスファターゼと比較して、磷酸エステル加水分解活性と磷酸転移活性がいずれも低下していたが、磷酸エステル加水分解活性の方が低下の程度が大きく、その結果、変異型酸性フォスファターゼの磷酸エステル加水分解活性／磷酸転移活性の比は野生型酸性フォスファターゼに比べて低くなっていた。

表 8

プラスミド	磷酸エステル分解 活性 (units/mg)	磷酸転移活性 (units/mg)	分解活性／転移活性 (相対値)
pMPI505	5.91	0.625	9.45 (100)
pMPI510	0.59	0.090	6.55 (69)
pMPI520	2.24	0.583	3.84 (40)
pMPI530	1.07	0.318	3.36 (35)

実施例 1 2 磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼ

遺伝子保持株を用いたイノシンから 5' - イノシン酸の生産

変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pMPI510、エシェリヒア・コリ JM109/pMPI520、エシェリヒア・コリ JM109/pMPI530及び野生型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pMPI505をアンピシリン100 μ g/ml及び IPTG 1 mMを含むL培地50mlに接種し、37°Cで16時間培養した。

ピロ磷酸ナトリウム12g/dl及びイノシン6g/dlを100mM酢酸ナトリウムバッファー (pH4.0) に溶解し、これに上記の培養で得たエシェリヒア・コリ各菌株の菌体を乾燥菌体重量で100mg/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、30°Cで22時間反応を行い、経時的に生成した5' - イノシン酸の量を測定した。結果を図5に示す。

図5中、縦軸は5' - イノシン酸の濃度 (mg/dl) を、横軸は反応時間 (h) を、また黒埋め円形はエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) JM109/pMPI505、黒埋め三角形はエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) JM109/pMPI510、白抜き円形はエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) JM109/pMPI520、白抜き四角形はエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) JM109/pMPI530の各菌体を使用した場合の反応の推移を示す。

磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いたイノシンから5' - イノシン酸の生産反応においては生成した5' - イノシン酸の分解速度が低下しており、その結果として5' - イノシン酸の収率及び蓄積量

が向上した。72番目のグリシン残基及び151番目のイソロイシン残基がそれぞれアスパラギン酸残基及びスレオニン残基へと置換された変異型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株エシェリヒア・コリ JM109/pMPI530が最も高い5'-イノシン酸の蓄積を示した。

実施例 13 磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた各種ヌクレオシド-5'-磷酸エステルの生産

変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pMPI530をアンピシリン100 μ g/ml及びIPTG1mMを含むL培地50mlに接種し、37℃で16時間培養した。

ピロ磷酸ナトリウム12g/dl及び磷酸受容体としてイノシン、グアノシン、ウリジン又はシチジン6g/dlを100mM酢酸ナトリウムバッファー (pH4.5) に溶解し、これに上記の菌体を乾燥菌体重量で100mg/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、30℃で22時間反応させた。生成したヌクレオシド-5'-磷酸エステルの量を表9に示した。なお、生成したヌクレオチドはヌクレオシド-5'-磷酸エステルのみでヌクレオシド-2'-磷酸エステル及びヌクレオシド-3'-磷酸エステルの副生は全く認められなかった。

表9

ヌクレオシド	生成物	生成量 (g/dl)
イノシン	5'-イノシン酸	10.01
グアノシン	5'-グアニル酸	6.72
ウリジン	5'-ウリジル酸	11.90
シチジン	5'-シチジル酸	7.82

実施例 14 磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた各種磷酸化合物を磷酸供与体とする5'-イノシン酸の生産

変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア

・ コリ JM109/pMPI530を、アンピシリン100 μ g/ml及びIPTG 1mMを含むL培地50mlに接種し、37℃で16時間培養した。

イノシン 6 g/dl及び磷酸供与体としてトリポリ磷酸ナトリウム、ポリ磷酸ナトリウム（商品名：ポリゴンP、千代田化学（株）製品）、フェニル酢酸ジナトリウム又はカルバミル磷酸ジナトリウム10g/dlを酢酸ナトリウムバッファー（pH4.5）に溶解し、これに上記の菌体を乾燥菌体重量で100mg/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら30℃で22時間反応させた。生成した5'-イノシン酸の量を表10に示した。いずれの磷酸供与体を用いた場合にも効率よく5'-イノシン酸が生成蓄積したが、ポリ磷酸を磷酸供与体として用いた場合に最も5'-イノシン酸の蓄積量が高かった。

表10

磷酸供与体	生成5'-イノシン酸 (g/dl)
トリポリ磷酸ナトリウム	8.93
ポリ磷酸ナトリウム	11.45
フェニル酢酸ジナトリウム	9.62
カルバミル磷酸ジナトリウム	9.89

実施例15 エシェリヒア・ブラッタエ染色体からの酸性フォスファターゼをコードする遺伝子の単離

(1) N末端アミノ酸配列の決定

エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650の無細胞抽出液から精製した酸性フォスファターゼをDITCメンブレン（ミリジェン/バイオサーチ社製）に吸着させ、Prosequencer 6625（ミリジェン/バイオサーチ社製）を用いてN末端のアミノ酸配列を決定した。配列表配列番号8に示す15残基のN末端アミノ酸配列が決定された。

(2) 酸性フォスファターゼをコードする遺伝子断片の単離

エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650の培養菌体からMurray and Thomsonの方法

(Nucl. Acid Res., 4321, 8 (1980)) に従い、染色体 DNA を調製した。これを S a u 3 A I で部分分解した後、ショ糖密度勾配遠心分離により 3 ~ 6 Kbp の DNA 断片を分画した。プラスミドベクター pUC118 (宝酒造社製) を B a m H I で切断し、部分分解した染色体 DNA 断片と連結させた。DNA の連結は DNA ライゲーションキット (宝酒造社製) を用い、指定された方法にて行った。次いで、得られた DNA 混合物を用いて常法によりエシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造社製) を形質転換した。形質転換体をアンピシリン 100 μ g/ml を含む L 寒天培地上にプレーティングして生育させ、遺伝子ライブラリーを作成した。

形質転換体の生育した寒天培地の表面に 4 mM p-ニトロフェニル燐酸及び 100 mM メス/NaOH バッファー (pH6.5) を含む反応液を注ぎ、30℃で15分間保温した。フォスファターゼ活性を発現した菌は、p-ニトロフェノールを遊離して黄色を示すため、これを指標として、形質転換体を選択した。約 8,000 株の形質転換体の染色体遺伝子発現ライブラリーを探索した結果、フォスファターゼ活性を発現した形質転換体 14 株が得られた。

フォスファターゼ活性を発現した 14 株の形質転換体を単コロニー分離し、アンピシリン 100 μ g/ml を含む L 培地 2.5ml に接種し、37℃で16時間培養した。培養液から集菌した菌体にイノシン 2 g/dl 及びピロ燐酸ナトリウム 10g/dl を含む 100mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH5.0) 50 μ l を添加し、30℃ 16時間反応を行った。HPLC 分析にて 5'-イノシン酸の生成を検出し、燐酸転移活性を持つ菌株を選択した。その結果、燐酸転移活性を示し、目的の酸性フォスファターゼ遺伝子断片を保有すると予想される形質転換体 3 株を得ることができた。

実施例 16 エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650 由来酸性フォスファターゼ 遺伝子の塩基配列の決定

実施例 15 で得られたエシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650 由来酸性フォスファターゼ遺伝子を含む DNA 断片を保有すると予想される形質転換体の 1 株よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、挿入された DNA 断片の解析を行った。このプラスミドを pEP1301 と命名した。決定した挿入された DNA 断片の制限

酵素地図を図 6 に示す。

さらにサブクローニングにより酸性フォスファターゼ遺伝子領域を限定した結果、制限酵素 C l a I と B a m H I で切り出される 2.4 kbp の大きさの断片中に本酸性フォスファターゼ遺伝子が含まれることが示唆された。そこで塩基配列の決定のために該断片を C l a I 及び B a m H I で切断した pBluescript KS (+) (ストラテジーン社製) に結合したプラスミド DNA を構築した。pEPI305 と命名したこのプラスミド DNA を用いて常法によりエシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造製) を形質転換し、これをアンピシリン 100 μ g/ml を含む L 寒天培地上にプレーティングし、形質転換体を得た。

pEPI305 を保有するエシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造製) の形質転換体よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、塩基配列の決定を行った。決定したオープン・リーディング・フレームの塩基配列を配列表配列番号 9 に示した。この塩基配列より推定される蛋白質のアミノ酸配列を配列表配列番号 10 に示した。このアミノ酸配列中に精製酵素の N 末端アミノ酸配列と完全に一致する配列が存在した。精製酵素の N 末端は配列表配列番号 10 の配列の 19 番目のロイシン残基から開始していたため、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列は前駆体蛋白質の配列であり、1 番目のメチオニン残基から 18 番目のアラニン残基までのペプチドは翻訳後に除去されるものと考えられた。これより推定される成熟蛋白質のアミノ酸配列を配列表配列番号 11 に示した。これより予想される成熟蛋白質の分子量は 25.1 キロダルトンと算出され、精製酵素 SDS-PAGE の結果とよく一致した。以上の結果及び本断片を含むプラスミドを有する形質転換体が磷酸転移活性を示すことから本オープン・リーディング・フレームは目的の酸性フォスファターゼをコードする領域であると同定した。

すなわち、配列表番号 11 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする遺伝子が、エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650 の酸性フォスファターゼ遺伝子である。

塩基配列、アミノ酸配列各々について既知の配列との相同性比較を行った。用いたデータベースは EMBL 及び SWISS-PROT である。その結果、配列表番号 8 に示される蛋白質及びそれをコードする DNA は新規であることが判

明した。本遺伝子のコードする前駆体蛋白質は249個のアミノ酸から成り、その配列から予想される蛋白質の分子量は27.0キロダルトンであった。

アミノ酸配列各々について既知の配列との相同性比較を行った結果、本蛋白質はプロビデンシア・スチュアルティ (*Providencia stuartii*) の酸性フォスファターゼと77.4%、実施例8のモルガネラ・モルガニ (*Morganella morganii*) の酸性フォスファターゼと77.1%、サルモネラ・チヒムリウム (*Salmonella typhimurium*) の酸性フォスファターゼと44.3%の相同性を示した。

なお、pEPI305をエシェリヒア・コリ JM 109に保持させた株は、AJ13144と命名され、平成8年2月23日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）にブタペスト条約に基づき国際寄託され、受託番号FERM BP-5423が付与されている。

実施例17 エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650 由来の酸性フォスファターゼ 遺伝子の発現による活性の増幅

実施例16で作成したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI305をアンピシリン100 μ g/ml及びIPTG 1mMを含むL培地50mlに接種し、37℃で16時間培養した。該培養液から遠心分離により菌体を集め、生理食塩水で1回洗浄した。菌体を5mlの100mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) に懸濁し、4℃で20分間超音波処理を行い菌体を破砕した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。

得られた無細胞抽出液の磷酸転移活性を、プラスミドpBluescript KS (+) で同様に形質転換したエシェリヒア・コリ JM109及びエシェリヒア・ブラッタエ野生株より調製した無細胞抽出液を対照として測定した結果を表11に示した。エシェリヒア・コリ JM109/pBluescript KS (+) では磷酸転移活性は検出されず、エシェリヒア・ブラッタエ野生株でも磷酸転移活性は低かった。一方、エシェリヒア・コリ JM109/pEPI305はエシェリヒア・ブラッタエ野生株に比べて比活性で120倍と高い磷酸転移活性を示しており、この結果から導入したDNA断片がエシェリヒア・コリにおいて酸性フォスファターゼを高発現していることが示された。

表 1 1

菌 株	磷酸転移活性(units/mg)
エシェリヒア・ブラッタエ JCM1650	0.002
エシェリヒア・コリ JM109/pBluescript KS(+)	検出せず
エシェリヒア・コリ JM109/pEPI305	0.264

実施例 1 8 エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650 由来の酸性フォスファターゼ
遺伝子保持株を用いたイノシンから 5' -イノシン酸の生産

ピロリン酸ナトリウム 12g/dl 及びイノシン 6 g/dl を 100mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH4.0) に溶解し、これに上記のエシェリヒア・コリ JM109/pEPI305 の菌体を乾燥菌体重量で 200mg/dl となるように添加し、pH を 4.0 に維持しながら、35℃ で 10 時間反応を行い、経時的に生成した 5' -イノシン酸の量を測定した。なお、生成したイノシン酸は 5' -イノシン酸のみで 2' -イノシン酸及び 3' -イノシン酸の副生は全く認められなかった。結果を図 7 に示す。本菌を用いたピロリン酸とイノシンからの 5' -イノシン酸生産反応においては、非常に効率よく短時間で 5' -イノシン酸が生成蓄積した。

実施例 1 9 磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼ
遺伝子の作成

実施例 1 7 及び 1 8 に示したようにエシェリヒア・ブラッタエ由来酸性フォスファターゼ遺伝子保持株は著量の酸性フォスファターゼを発現し、本菌を用いたピロリン酸とイノシンからの 5' -イノシン酸生産反応においては、非常に効率よく短時間で 5' -イノシン酸が生成蓄積する。しかし、生成した 5' -イノシン酸が酸性フォスファターゼ自体が有する磷酸エステル加水分解活性によって分解を受けるために 5' -イノシン酸の蓄積量がある程度以上上がらないことが判明

した。そこで実施例 15 にてクローニングしたエシェリヒア・ブラッタエ由来酸性フォスファターゼ遺伝子に PCR を用いる部位特異的変異法により変異を導入し酵素の性質の改良を行うこととした。

DNA 合成装置（アプライドバイオシステム社製モデル 394）を用いてホスホアミダイト法にて配列表配列番号 12、13 及び 14 に示すオリゴヌクレオチド MUT300、MUT310 及び MUT320 をそれぞれ合成した。

鋳型として実施例 16 で調製したプラスミド pEPI305 1 ng、プライマーとして M13 プライマー RV（宝酒造社製）及び MUT310 オリゴヌクレオチド各 2.5 μ mol 及び タック DNA ポリメラーゼ（宝酒造社製）2.5 ユニットを dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 200 μ M、塩化カリウム 50mM 及び塩化マグネシウム 1.5mM を含む 100mM トリスー塩酸緩衝液（pH8.3）100 μ l に添加し、94°C を 30 秒、55°C を 2 分、72°C を 3 分のサイクルを 25 回繰り返す PCR 反応を行った。PCR 反応はサーマルサイクラー PJ2000 型（宝酒造社製）を用いて行った。また別に、鋳型としてプラスミド pEPI305 1 ng、プライマーとして M13 プライマー M3（宝酒造社製）及び MUT300 オリゴヌクレオチド各 2.5 μ mol を用いて同様に PCR 反応を行った。それぞれの反応液をマイクロスピナラム S-400（ファルマシア社製）を用いてゲル濾過により精製し、プライマーを除去した。

それぞれの PCR 反応液 1 μ l を dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 200 μ M、塩化カリウム 50mM 及び塩化マグネシウム 1.5mM を含む 100mM トリスー塩酸緩衝液（pH8.3）95 μ l に添加し、94°C で 10 分加熱後、60 分間かけて 37°C まで冷却した後、37°C で 15 分保温しヘテロ二本鎖を形成させた。これにタック DNA ポリメラーゼ 2.5 ユニットを添加して 72°C で 3 分反応を行い、ヘテロ二本鎖を完成させた。次に、この反応液に M13 プライマー RV 及び M13 プライマー M3 各 2.5 μ mol を添加して、94°C を 30 秒、55°C を 2 分、72°C を 3 分のサイクルを 10 回繰り返す PCR 反応を行った。

2 回目の PCR 反応の生成物を ClaI と BamHI で切断後フェノール／クロロホルム抽出し、エタノール沈殿した。この DNA 断片を ClaI と BamHI で切断した pBluescript KS (+) に結合し、得られたプラスミド DNA を用いて常法によりエシェリヒア・コリ JM109（宝酒造製）を形質転換した。これを 10 μ g/ml のアンピシリンを含む L 寒天培地上にプレーティングし、形質転換体を得

た。

形質転換体よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、塩基配列の決定を行い、目的の塩基が置換されていることを確認した。このようにして成熟蛋白質の74番目のグリシン残基 (GGG) がアスパラギン酸残基 (G^{*}A^{*}T) に置換した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子を作成した。この変異型遺伝子を含むプラスミドをpEPI310と命名した。

鋳型としてpEPI305、プライマーとしてMUT300とMUT320オリゴヌクレオチドを用いて同様の操作により、成熟蛋白質の153番目のイソロイシン残基 (ATC) がスレオニン残基 (A^{*}CC) に置換した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子を作成した。この変異型遺伝子を含むプラスミドをpEPI320と命名した。さらに鋳型としてpEPI310、プライマーとしてMUT300とMUT320オリゴヌクレオチドを用いて同様の操作により、成熟蛋白質の74番目のグリシン残基 (GGG) がアスパラギン酸残基 (G^{*}A^{*}T) に、153番目のイソロイシン残基 (ATC) がスレオニン残基 (A^{*}CC) に置換した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子を作成した。この変異型遺伝子を含むプラスミドをpEPI330と命名した。

それぞれの変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI310、エシェリヒア・コリ JM109/pEPI320、エシェリヒア・コリ JM109/pEPI330及び野生型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI305をアンピシリン100 µg/ml及びIPTG 1 mMを含むL培地50mlに接種し、37℃で16時間培養した。該培養液から遠心分離により菌体を集め、生理食塩水で1回洗浄した。菌体を5 mlの10 mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) に懸濁し、4℃で20分間超音波処理を行い破碎した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。得られた無細胞抽出液の磷酸エステル加水分解活性及び磷酸転移活性をpH4.0にて測定し、野生株のものと比較した。

野生型および変異型酸性フォスファターゼの磷酸エステル加水分解活性及び磷酸転移活性を測定した結果を表12に示す。変異型酸性フォスファターゼは、野生型酸性フォスファターゼと比較して、磷酸エステル加水分解活性と磷酸転移活性がいずれも低下していたが、磷酸エステル加水分解活性の方が低下の程度が大

きく、その結果、変異型酸性フォスファターゼの磷酸エステル加水分解活性／磷酸転移活性の比は野生型酸性フォスファターゼに比べて低くなっていた。

表 1 2

プラスミド	磷酸エステル分解 活性 (units/mg)	磷酸転移活性 (units/mg)	分解活性／転移活性 (相対値)
pEPI305	2.38	0.132	18.03 (100)
pEPI310	0.26	0.019	13.68 (76)
pEPI320	0.88	0.123	7.15 (39)
pEPI330	0.42	0.070	6.00 (33)

実施例 2 0 磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子 保持株を用いたイノシンから 5' - イノシン酸の生産

変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI310、エシェリヒア・コリ JM109/pEPI320、エシェリヒア・コリ JM109/pEPI330及び野生型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI305をアンピシリン100 μ g/ml及び IPTG 1 mMを含むL培地50mlに接種し、37℃で16時間培養した。

ピロ磷酸ナトリウム12g/dl及びイノシン6g/dlを酢酸ナトリウムバッファー (pH4.0) に溶解し、これに上記培養で得たエシェリヒア・コリ各菌株の菌体を乾燥菌体重量で200mg/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、35℃で32時間反応を行い、経時的に生成した5' - イノシン酸の量を測定した。結果を図8に示す。

図8中、縦軸は5' - イノシン酸の濃度 (mg/dl) を、横軸は反応時間 (h) を、また黒埋め円形はエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) JM109/pEPI305、黒埋め三角形はエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) JM109/pEPI310、白抜き円形はエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) JM109/pEPI320、白抜き四角形はエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) JM109/pEPI330の各菌体を使用した場合の反応の推移を示す。

磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いたイノシンから5'-イノシン酸の生産反応においては生成した5'-イノシン酸の分解速度が低下しており、その結果として5'-イノシン酸の収率及び蓄積量が向上した。74番目のグリシン残基及び153番目のイソロイシン残基がそれぞれアスパラギン酸残基及びスレオニン残基へと置換された変異型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株エシェリヒア・コリ JM109/pEPI330が最も高い5'-イノシン酸の蓄積を示した。

実施例 2 1 磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた各種ヌクレオシド-5'-磷酸エステルの生産

変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI330をアンピシリン100 μ g/ml及びIPTG 1mMを含むL培地50mlに接種し、37℃で16時間培養した。

ピロ磷酸ナトリウム12g/dl及び磷酸受容体としてイノシン、グアノシン、ウリジン又はシチジン 6g/dlを100mM酢酸ナトリウムバッファー (pH4.5) に溶解し、これに上記の菌体を乾燥菌体重量で200mg/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、35℃で32時間反応させた。生成したヌクレオシド-5'-磷酸エステルの量を表13に示した。なお、生成したヌクレオチドはヌクレオシド-5'-磷酸エステルのみでヌクレオシド-2'-磷酸エステル及びヌクレオシド-3'-磷酸エステルの副生は全く認められなかった。

表 1 3

ヌクレオシド	生成物	生成量 (g/dl)
イノシン	5'-イノシン酸	7.45
グアノシン	5'-グアニル酸	4.77
ウリジン	5'-ウリジル酸	8.93
シチジン	5'-シチジル酸	6.60

実施例 2 2 磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子
保持株を用いる各種磷酸化合物を磷酸供与体とする 5' - イノシン酸の生産

変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI330 をアンピシリン 100 μ g/ml 及び IPTG 1 mM を含む L 培地 50ml に接種し、37℃ で 16 時間培養した。

イノシン 6 g/dl 及び磷酸供与体としてトリポリ磷酸ナトリウム、ポリ磷酸ナトリウム（商品名：ポリゴン P、千代田化学（株）製品）、フェニル酢酸ジナトリウム又はカルバミル磷酸ジナトリウム 12g/dl を 100mM 酢酸ナトリウムバッファー（pH4.0）に溶解し、これに上記の菌体を乾燥菌体重量で 200mg/dl となるように添加し、pH を 4.0 に維持しながら、35℃ で 32 時間反応させた。生成した 5' - イノシン酸の量を表 1 4 に示した。いずれの磷酸供与体を用いた場合にも効率よく 5' - イノシン酸が生成蓄積したが、ポリ磷酸を磷酸供与体として用いた場合に最も 5' - イノシン酸の蓄積量が高かった。

表 1 4

磷酸供与体	生成 5' - イノシン酸 (g/dl)
トリポリ磷酸ナトリウム	5.96
ポリ磷酸ナトリウム	8.84
フェニル酢酸ジナトリウム	7.60
カルバミル磷酸ジナトリウム	7.73

実施例 2 3 プロビデンシア・スチュアルティ染色体からの
酸性フォスファターゼをコードする遺伝子の単離と塩基配列の確認

既知のプロビデンシア・スチュアルティの酸性フォスファターゼ遺伝子の塩基配列（EMBL Accession number X64820）を基に、該酸性フォスファターゼ遺伝子を増幅するようにデザインした配列表配列番号 1 5 及び 1 6 に示す配列を有する PCR 用オリゴヌクレオチドプライマー PRP1 及び PRP2 を合成した。

プロビデンシア・スチュアルティ ATCC 29851 の培養菌体から、Murry and Tho

mpsonの方法 (Nucl. Acid Res., 4321, 8, (1980)) に従い染色体DNAを調製した。鋳型としてこの染色体DNA 0.1ng、プライマーとしてPRP1及びPRP2オリゴヌクレオチド各2.5 μ mol並びにタックDNAポリメラーゼ (宝酒造社製) 2.5ユニットをdATP、dCTP、dGTP、dTTP各200 μ M、塩化カリウム50mM及び塩化マグネシウム1.5mMを含む100mMトリス-塩酸緩衝液 (pH8.3) 100 μ lに添加し、94 $^{\circ}$ Cを30秒、55 $^{\circ}$ Cを2分、72 $^{\circ}$ Cを3分のサイクルを30回繰り返すPCR反応を行った。反応液をアガロース電気泳動に供し、増幅された約1 kbpのDNA断片をガラスパウダー (宝酒造社製) を用いて回収した。この遺伝子断片をBamHIで切断後、BamHIで切断したpUC118に結合した。このプラスミドをpPRP100と命名した。

pPRP100を導入したエシェリヒア・コリ JM109/pPRP100の磷酸エステル加水分解活性及び磷酸転移活性を測定した。その結果、本菌は磷酸エステル加水分解活性だけでなく、ヌクレオシドへの磷酸転移活性も示した。

エシェリヒア・コリ JM109/pPRP100よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、塩基配列の決定を行った。決定したオープン・リーディング・フレームの塩基配列及びこの塩基配列より推定される蛋白質のアミノ酸配列を配列表配列番号17及び配列番号18に示した。本オープン・リーディング・フレームの塩基配列は既知のプロビデンシア・スチュアルティの酸性フォスファターゼ遺伝子の塩基配列と完全に一致した。

実施例24 エンテロバクター・アエロゲネス、クレブシエラ・プランティコラ及びセラチア・フィカリアの染色体からの酸性フォスファターゼをコードする遺伝子の単離と塩基配列の決定

エンテロバクター・アエロゲネス IFO 12010、クレブシエラ・プランティコラ IFO 14939及びセラチア・フィカリア IAM 13540の培養菌体からMurry and Thompsonの方法 (Nucl. Acid Res., 4321, 8, (1980)) に従い、それぞれの染色体DNAを調製した。ついで、実施例7(2)と同様の方法により、約20,000株のエシェリヒア・コリ JM109の形質転換体よりなる染色体遺伝子発現ライブラリーをそれぞれ作成し、探索した結果、磷酸転移活性を示す形質転換体を得ることができ

た。これらの形質転換体はそれぞれの菌株由来の酸性フォスファターゼ遺伝子を保有すると考えられた。

エンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010由来の酸性フォスファターゼ遺伝子を保有すると考えられるエシェリヒア・コリ JM109形質転換体の1株よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、挿入されたDNA断片の解析を行った。このプラスミドをpENP100と命名した。決定したエンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010由来の挿入DNA断片の制限酵素地図を図9に示す。

サブクローニングにより、酸性フォスファターゼ遺伝子領域を限定した結果、制限酵素S a l Iと制限酵素K p n Iで切り出される1.6kbpの断片中に本酸性フォスファターゼ遺伝子が含まれることが示唆された。そこで塩基配列の決定のためにこのS a l I - K p n I断片をS a l I及びK p n Iで切断したpUC118に結合したプラスミドDNAを構築した。このプラスミドをpENP110と命名した。

同様に、クレブシエラ・プランティコラ IF0 14939由来の酸性フォスファターゼ遺伝子断片を保有すると考えられるエシェリヒア・コリ JM109形質転換体の1株よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、挿入されたDNA断片の解析を行った。このプラスミドをpKLP100と命名した。決定したクレブシエラ・プランティコラ IF0 14939由来の挿入DNA断片の制限酵素地図を図10に示す。

サブクローニングにより、酸性フォスファターゼ遺伝子領域を限定した結果、制限酵素K p n Iと制限酵素E c o R Iで切り出される2.2kbpの断片中に本酸性フォスファターゼ遺伝子が含まれることが示唆された。そこで塩基配列の決定のためにこのK p n I - E c o R I断片をK p n IとE c o R Iで切断したpUC118に結合したプラスミドDNAを構築した。このプラスミドをpKLP110と命名した。

また、セラチア・フィカリア IAM 13540由来の酸性フォスファターゼ遺伝子断片を保有すると考えられるエシェリヒア・コリ JM109形質転換体の1株よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、挿入されたDNA断片の解析を行った。このプラスミドをpSEP100と命名した。決定したセラチア・フィカリア IAM 13540由来の挿入DNA断片の制限酵素地図を図11に示す。

サブクローニングにより、酸性フォスファターゼ遺伝子領域を限定した結果、制限酵素H i n d I I Iで切り出される1.4kbpの断片中に本酸性フォスファターゼ遺

伝子が含まれることが示唆された。そこで塩基配列の決定のためにこのHindIII断片をHindIIIで切断したpUC118に結合したプラスミドDNAを構築した。このプラスミドをpSEP110と命名した。

pENP110、pKLP110及びpSEP110をそれぞれ導入したエシェリヒア・コリ JM109/pENP110、エシェリヒア・コリ JM109/pKLP110及びエシェリヒア・コリ JM109/pSEP110の形質転換体よりアルカリ溶菌法によりそれぞれのプラスミドを調製し、実施例8の方法に従い、挿入断片の塩基配列の決定を行った。決定したそれぞれの挿入断片のオープン・リーディング・フレームの塩基配列のうちエンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010由来のものを配列表配列番号19に、クレブシエラ・プランティコラ IF0 14939由来のものを配列表配列番号21に、そしてセラチア・フィカリア IAM 13540由来のものを配列表配列番号23に示した。また、各々の推定されるアミノ酸配列を配列表配列番号20、22、24に示した。各DNA断片を含むプラスミドを有する形質転換体が磷酸転移活性を示したことから、これらのオープン・リーディング・フレームは目的の酸性フォスファターゼ遺伝子であると同定した。

塩基配列、アミノ酸配列各々について既知の配列との相同性比較を行った。用いたデータベースはEMBL及びSWISS-PROTである。その結果、配列表配列番号19、21及び23に示される遺伝子はいずれも新規な遺伝子であることが判明した。また、エンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010由来の遺伝子がコードする蛋白質は248個、クレブシエラ・プランティコラ IF0 14939由来の遺伝子がコードする蛋白質は248個、セラチア・フィカリア IAM 13540由来の遺伝子がコードする蛋白質は244個のアミノ酸からそれぞれなるものと推定された。なお、これらの蛋白質は、モルガネラ・モルガニ及びエシェリヒア・ブラッタエの酸性フォスファターゼの場合と同様、前駆体蛋白質である可能性がある。

また、これらの塩基配列より予想される蛋白質のアミノ酸配列を実施例8で推定したモルガネラ・モルガニ NCIMB 10466、実施例16で推定したエシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650及び既知のプロビデンシア・スチュアルティ (EMBL Accession number X64820) の酸性フォスファターゼの前駆体蛋白質のアミノ酸配列と共にアミノ酸の一字表記で図12に示した。図中ですべてのアミノ酸配列にお

いて共通のアミノ酸残基を配列の下に*で示した。

図12に示したように6種類の菌株由来の酸性フォスファターゼのアミノ酸配列は非常に相同性が高く、130個のアミノ酸残基がすべてのアミノ酸配列において共通していた。これより、これらの酸性フォスファターゼは非常に類似する機能を持つことが予想される。

実施例25 プロビデンシア・スチュアルティ、エンテロバクター・
アエロゲネス、クレブシエラ・プランティコラ 及び
セラチア・フィカリア由来の酸性フォスファターゼ
遺伝子の発現による活性の増幅

実施例23にて構築したエシェリヒア・コリ JM109/pPRP100、実施例24にて構築したエシェリヒア・コリ JM109/pENP110、エシェリヒア・コリ JM109/pKLP110及びエシェリヒア・コリ JM109/pSEP110をアンピシリン100 μ g/ml及びIPTG 1mMを含む培地50mlに接種し、37℃で16時間培養した。該培養液から遠心分離により菌体を集め、生理食塩水で1回洗浄した。菌体を5mlの100mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) に懸濁し、4℃で20分間超音波処理を行い破碎した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。

得られた無細胞抽出液の磷酸転移活性を、プロビデンシア・スチュアルティ ATCC 29851、エンテロバクター・アエロゲネス IFO 12010、クレブシエラ・プランティコラ IFO 14939、セラチア・フィカリア IAM 13540及びプラスミドpUC118で同様に形質転換したエシェリヒア・コリ JM109より調製した無細胞抽出液の活性を対照として測定した結果を表15に示した。いずれの菌も野生株の磷酸転移活性は低かった。また、エシェリヒア・コリ JM109/pUC118では磷酸転移活性は検出されなかった。一方、酸性フォスファターゼ遺伝子を導入したエシェリヒア・コリ JM109の形質転換体はいずれも野生株に比べて高い磷酸転移活性を示しており、この結果から導入した遺伝子断片がエシェリヒア・コリにおいて酸性フォスファターゼを高発現していることが示された。

表 1 5

菌 株	磷酸転移活性 (units/mg)
プロビデンシア・スチュアルティ ATCC 29851	0.006
エンテロバクター・アエロゲネス IFO 12010	0.002
クレブシエラ・プランティコラ IFO 14939	0.002
セラチア・フィカリア IAM 13540	0.001
エシェリヒア・コリ JM109/pUC118	検出せず
エシェリヒア・コリ JM109/pPRP100	0.833
エシェリヒア・コリ JM109/pENP110	0.301
エシェリヒア・コリ JM109/pKLP110	0.253
エシェリヒア・コリ JM109/pSEP110	0.123

産業上の利用分野

本発明により、酸性ホスファターゼをpH3.0～5.5の条件下でヌクレオシド並びにポリ磷酸（塩）、フェニル磷酸（塩）及びカルバミル磷酸（塩）から成る群より選択される磷酸供与体に作用させることにより、安価かつ効率よくヌクレオシドー5'－磷酸エステルを製造することができる。特に、本発明により提供される磷酸エステル加水分解活性を低下させる変異を有する酸性ホスファターゼを用いることにより、一層効率よくヌクレオシドー5'－磷酸エステルを製造することができる。

配列表

(1) 一般情報

- (i) 出願人：味の素株式会社
- (ii) 発明の名称：ヌクレオシド-5'-リン酸エステルの製造法
- (iii) 配列数：24
- (iv) 連絡先：
 - (A) 宛名：
 - (B) 番地：
 - (C) 市：
 - (D) 州：
 - (E) 国：
 - (F) ZIP：
- (v) コンピュータ読取り可能形式
 - (A) 媒体：
 - (B) コンピュータ：
 - (C) 操作システム：
 - (D) ソフトウェア：
- (vi) 現行出願データ
 - (A) 出願番号
 - (B) 出願日
 - (C) 分類
- (viii) 代理人／事務所情報
 - (A) 名前：
 - (B) 登録番号：
 - (C) 整理番号：
- (ix) 通信情報
 - (A) 電話番号：
 - (B) ファクシミリ番号：

(2) 配列番号1の配列の情報：

- (i) 配列の性質：
 - (A) 配列の長さ：20 amino acids
 - (B) 配列の型：アミノ酸
 - (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：タンパク質
- (v) フラグメント型：N末端フラグメント

(vi) 起源:

(A) 生物名: モルガネラ・モルガニ (*Morganella morganii*)

(B) 株名: NCIMB 10466

(xi) 配列: SEQ ID NO:1:

Ala Ile Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro Asp Leu Tyr Tyr

1

5

10

15

Leu Lys Asn Glu

20

(2) 配列番号 2 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 750 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Genomic DNA

(vi) 起源:

(A) 生物名: モルガネラ・モルガニ (*Morganella morganii*)

(B) 株名: NCIMB 10466

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 1..747

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: sig_peptide

(B) 存在位置: 1..60

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: mat_peptide

(B) 存在位置: 61..747

(xi) 配列: SEQ ID NO:2:

ATG AAG AAG AAT ATT ATC GCC GGT TGT CTG TTC TCA CTG TTT TCC CTT	48
Met Lys Lys Asn Ile Ile Ala Gly Cys Leu Phe Ser Leu Phe Ser Leu	
-20 -15 -10 -5	
TCC GCG CTG GCC GCG ATC CCG GCG GGC AAC GAT GCC ACC ACC AAG CCG	96
Ser Ala Leu Ala Ala Ile Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro	
1 5 10	
GAT TTA TAT TAT CTG AAA AAT GAA CAG GCT ATC GAC AGC CTG AAA CTG	144
Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Glu Gln Ala Ile Asp Ser Leu Lys Leu	
15 20 25	
TTA CCG CCA CCG CCG GAA GTC GGC AGT ATT CAG TTT TTA AAT GAT CAG	192
Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Gln Phe Leu Asn Asp Gln	
30 35 40	
GCA ATG TAT GAG AAA GGC CGT ATG CTG CGC AAT ACC GAG CGC GGA AAA	240
Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Met Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys	
45 50 55 60	
CAG GCA CAG GCA GAT GCT GAC CTG GCC GCA GGG GGT GTG GCA ACC GCA	288
Gln Ala Gln Ala Asp Ala Asp Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Ala	
65 70 75	
TTT TCA GGG GCA TTC GGC TAT CCG ATA ACC GAA AAA GAC TCT CCG GAG	336
Phe Ser Gly Ala Phe Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ser Pro Glu	
80 85 90	
CTG TAT AAA CTG CTG ACC AAT ATG ATT GAG GAT GCC GGT GAT CTT GCC	384
Leu Tyr Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala	
95 100 105	
ACC CGC TCC GCC AAA GAA CAT TAC ATG CGC ATC CGG CCG TTT GCG TTT	432
Thr Arg Ser Ala Lys Glu His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe	
110 115 120	
TAC GGC ACA GAA ACC TGT AAT ACC AAA GAT CAG AAA AAA CTC TCC ACC	480
Tyr Gly Thr Glu Thr Cys Asn Thr Lys Asp Gln Lys Lys Leu Ser Thr	
125 130 135 140	

AAC GGA TCT TAC CCG TCA GGT CAT ACG TCT ATC GGC TGG GCA ACC GCA	528
Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala	
145 150 155	
CTG GTG CTG GCG GAA GTG AAC CCG GCA AAT CAG GAT GCG ATT CTG GAA	576
Leu Val Leu Ala Glu Val Asn Pro Ala Asn Gln Asp Ala Ile Leu Glu	
160 165 170	
CGG GGT TAT CAG CTC GGA CAG AGC CCG GTG ATT TGC GGC TAT CAC TGG	624
Arg Gly Tyr Gln Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp	
175 180 185	
CAG AGT GAT GTG GAT GCC GCG CCG ATT GTC GGT TCA GCC GCT GTC GCG	672
Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Ala Val Ala	
190 195 200	
ACA TTA CAT TCC GAT CCG GCA TTT CAG GCG CAG TTA GCG AAA GCC AAA	720
Thr Leu His Ser Asp Pro Ala Phe Gln Ala Gln Leu Ala Lys Ala Lys	
205 210 215 220	
CAG GAA TTT GCA CAA AAA TCA CAG AAA TAA	750
Gln Glu Phe Ala Gln Lys Ser Gln Lys	
225 229	

(2) 配列番号 3 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 249 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(vi) 起源:

(A) 生物名: モルガネラ・モルガニ (Morganella morganii)

(B) 株名: NCIMB 10466

(xi) 配列: SEQ ID NO:3:

- 52 -

Met Lys Lys Asn Ile Ile Ala Gly Cys Leu Phe Ser Leu Phe Ser Leu
 -20 -15 -10 -5
 Ser Ala Leu Ala Ala Ile Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro
 1 5 10
 Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Glu Gln Ala Ile Asp Ser Leu Lys Leu
 15 20 25
 Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Gln Phe Leu Asn Asp Gln
 30 35 40
 Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Met Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys
 45 50 55 60
 Gln Ala Gln Ala Asp Ala Asp Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Ala
 65 70 75
 Phe Ser Gly Ala Phe Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ser Pro Glu
 80 85 90
 Leu Tyr Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala
 95 100 105
 Thr Arg Ser Ala Lys Glu His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe
 110 115 120
 Tyr Gly Thr Glu Thr Cys Asn Thr Lys Asp Gln Lys Lys Leu Ser Thr
 125 130 135 140
 Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala
 145 150 155
 Leu Val Leu Ala Glu Val Asn Pro Ala Asn Gln Asp Ala Ile Leu Glu
 160 165 170
 Arg Gly Tyr Gln Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp
 175 180 185
 Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Ala Val Ala
 190 195 200
 Thr Leu His Ser Asp Pro Ala Phe Gln Ala Gln Leu Ala Lys Ala Lys
 205 210 215 220

Gln Glu Phe Ala Gln Lys Ser Gln Lys

225

229

(2) 配列番号 4 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 229 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(vi) 起源:

(A) 生物名: モルガネラ・モルガニ (*Morganella morganii*)

(B) 株名: NCIMB 10466

(xi) 配列: SEQ ID NO:4:

Ala Ile Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro Asp Leu Tyr Tyr

1 5 10 15

Leu Lys Asn Glu Gln Ala Ile Asp Ser Leu Lys Leu Leu Pro Pro Pro

20 25 30

Pro Glu Val Gly Ser Ile Gln Phe Leu Asn Asp Gln Ala Met Tyr Glu

35 40 45

Lys Gly Arg Met Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys Gln Ala Gln Ala

50 55 60

Asp Ala Asp Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Ala Phe Ser Gly Ala

65 70 75 80

Phe Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ser Pro Glu Leu Tyr Lys Leu

85 90 95

Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala Thr Arg Ser Ala

100 105 110

Lys Glu His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe Tyr Gly Thr Glu

115 120 125

- 54 -

Thr Cys Asn Thr Lys Asp Gln Lys Lys Leu Ser Thr Asn Gly Ser Tyr

130

135

140

Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala Leu Val Leu Ala

145

150

155

160

Glu Val Asn Pro Ala Asn Gln Asp Ala Ile Leu Glu Arg Gly Tyr Gln

165

170

175

Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp Gln Ser Asp Val

180

185

190

Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Ala Val Ala Thr Leu His Ser

195

200

205

Asp Pro Ala Phe Gln Ala Gln Leu Ala Lys Ala Lys Gln Glu Phe Ala

210

215

220

Gln Lys Ser Gln Lys

225

229

(2) 配列番号 5 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 20 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iv) アンチセンス:

(xi) 配列: SEQ ID NO:5:

ATTACCATGA TTACGAATTC 20

(2) 配列番号 6 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 21 bases

(B) 配列の型: 核酸

- 55 -

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iv) アンチセンス:

(xi) 配列: SEQ ID NO:6:

GCGGTTGCCA CATCCCCTGC G 21

(2) 配列番号 7 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 21 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iv) アンチセンス:

(xi) 配列: SEQ ID NO:7:

TTGCCCAGCC GGTAGACGTA T 21

(2) 配列番号 8 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 15 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(v) フラグメント型: N末端フラグメント

(vi) 起源:

(A) 生物名: エシェリヒア・ブラッカエ (Escherichia blattae)

(B) 株名: JCM 1650

(xi) 配列: SEQ ID NO:8:

Leu Ala Leu Val Ala Thr Gly Asn Asp Thr Thr Thr Lys Pro Asp Leu

1

5

10

15

- 57 -

TTG CCG CCA CCA CCG GCG GTG GGC TCC ATT GCG TTT CTC AAC GAT CAG	192
Leu Pro Pro Pro Pro Ala Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln	
35 40 45	
GCC ATG TAT GAA CAG GGG CGC CTG CTG CGC AAC ACC GAA CGC GGT AAG	240
Ala Met Tyr Glu Gln Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys	
50 55 60	
CTG GCG GCG GAA GAT GCA AAC CTG AGC AGT GGC GGG GTG GCG AAT GCT	288
Leu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ser Gly Gly Val Ala Asn Ala	
65 70 75	
TTC TCC GGC GCG TTT GGT AGC CCG ATC ACC GAA AAA GAC GCC CCG GCG	336
Phe Ser Gly Ala Phe Gly Ser Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Ala	
80 85 90	
CTG CAT AAA TTA CTG ACC AAT ATG ATT GAG GAC GCC GGG GAT CTG GCG	384
Leu His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala	
95 100 105 110	
ACC CGC AGC GCG AAA GAT CAC TAT ATG CGC ATT CGT CCG TTC GCG TTT	432
Thr Arg Ser Ala Lys Asp His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe	
115 120 125	
TAT GGG GTC TCT ACC TGT AAT ACC ACC GAG CAG GAC AAA CTG TCC AAA	480
Tyr Gly Val Ser Thr Cys Asn Thr Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys	
130 135 140	
AAT GGC TCT TAT CCG TCC GGG CAT ACC TCT ATC GGC TGG GCT ACT GCG	528
Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala	
145 150 155	
CTG GTG CTG GCA GAG ATC AAC CCT CAG CGC CAG AAC GAG ATC CTG AAA	576
Leu Val Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln Arg Gln Asn Glu Ile Leu Lys	
160 165 170	
CGC GGT TAT GAG CTG GGC CAG AGC CGG GTG ATT TGC GGC TAC CAC TGG	624
Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp	
175 180 185 190	

CAG AGT GAT GTG GAT GCC GCG CGG GTA GTG GGA TCT GCC GTT GTG GCG 672
 Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Val Val Gly Ser Ala Val Val Ala
 195 200 205
 ACC CTG CAT ACC AAC CCG GCG TTC CAG CAG CAG TTG CAG AAA GCG AAG 720
 Thr Leu His Thr Asn Pro Ala Phe Gln Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys
 210 215 220
 GCC GAA TTC GCC CAG CAT CAG AAG AAA TAA 750
 Ala Glu Phe Ala Gln His Gln Lys Lys
 225 230

(2) 配列番号10の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 249 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(vi) 起源:

(A) 生物名: エシェリヒア・ブラッタエ (Escherichia blattae)

(B) 株名: JCM 1650

(xi) 配列: SEQ ID NO:10:

Met Lys Lys Arg Val Leu Ala Val Cys Phe Ala Ala Leu Phe Ser Ser
 -18 -15 -10 -5
 Gln Ala Leu Ala Leu Val Ala Thr Gly Asn Asp Thr Thr Thr Lys Pro
 1 5 10
 Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ser Glu Ala Ile Asn Ser Leu Ala Leu
 15 20 25 30
 Leu Pro Pro Pro Pro Ala Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln
 35 40 45
 Ala Met Tyr Glu Gln Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys
 50 55 60

Leu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ser Gly Gly Val Ala Asn Ala
 65 70 75
 Phe Ser Gly Ala Phe Gly Ser Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Ala
 80 85 90
 Leu His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala
 95 100 105 110
 Thr Arg Ser Ala Lys Asp His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe
 115 120 125
 Tyr Gly Val Ser Thr Cys Asn Thr Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys
 130 135 140
 Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala
 145 150 155
 Leu Val Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln Arg Gln Asn Glu Ile Leu Lys
 160 165 170
 Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp
 175 180 185 190
 Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Val Val Gly Ser Ala Val Val Ala
 195 200 205
 Thr Leu His Thr Asn Pro Ala Phe Gln Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys
 210 215 220
 Ala Glu Phe Ala Gln His Gln Lys Lys
 225 230

(2) 配列番号11の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 231 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(vi) 起源:

(A)生物名: エシェリヒア・ブラッタエ (Escherichia blattae)

(B)株名: JCM 1650

(xi) 配列: SEQ ID NO:11:

Leu Ala Leu Val Ala Thr Gly Asn Asp Thr Thr Thr Lys Pro Asp Leu

1 5 10 15

Tyr Tyr Leu Lys Asn Ser Glu Ala Ile Asn Ser Leu Ala Leu Leu Pro

20 25 30

Pro Pro Pro Ala Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln Ala Met

35 40 45

Tyr Glu Gln Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys Leu Ala

50 55 60

Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ser Gly Gly Val Ala Asn Ala Phe Ser

65 70 75 80

Gly Ala Phe Gly Ser Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Ala Leu His

85 90 95

Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala Thr Arg

100 105 110

Ser Ala Lys Asp His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe Tyr Gly

115 120 125

Val Ser Thr Cys Asn Thr Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys Asn Gly

130 135 140

Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala Leu Val

145 150 155 160

Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln Arg Gln Asn Glu Ile Leu Lys Arg Gly

165 170 175

Tyr Glu Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp Gln Ser

180 185 190

Asp Val Asp Ala Ala Arg Val Val Gly Ser Ala Val Val Ala Thr Leu

195 200 205

His Thr Asn Pro Ala Phe Gln Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys Ala Glu

210

215

220

Phe Ala Gln His Gln Lys Lys

225

230

(2) 配列番号12の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 20 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iv) アンチセンス:

(xi) 配列: SEQ ID NO:12:

CCTCGAGGTC GACGGTATCG 20

(2) 配列番号13の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 21 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iv) アンチセンス:

(xi) 配列: SEQ ID NO:13:

ATTCGCCACA TCGCCACTGC T 21

(2) 配列番号14の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 22 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iv) アンチセンス:

(xi) 配列: SEQ ID NO:14:

TAGCCCAGCC GGTAGAGGTA TG 22

(2) 配列番号15の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 25 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iv) アンチセンス:

(xi) 配列: SEQ ID NO:15:

CTGGATCCTG TGGCTATCAT CACCT 25

(2) 配列番号16の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 25 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iv) アンチセンス:

(xi) 配列: SEQ ID NO:16:

CTGGATCCGA CGCGATTTTA CCATA 25

CAA GCC GCT AAG GAT GCT GAT CTG GCT GCG GGC GGT GTT GCG AAC GCA	288
Gln Ala Ala Lys Asp Ala Asp Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Asn Ala	
85 90 95	
TTT TCT GAA GCT TTT GGT TAT CCC ATT ACC GAA AAG GAT GCG CCT GAA	336
Phe Ser Glu Ala Phe Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Glu	
100 105 110	
ATT CAT AAA TTG CTG ACG AAT ATG ATT GAA GAT GCG GGG GAT TTA GCA	384
Ile His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala	
115 120 125	
ACT CGC TCA GCC AAA GAG AAA TAC ATG CGC ATT CGT CCA TTT GCG TTC	432
Thr Arg Ser Ala Lys Glu Lys Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe	
130 135 140	
TAC GGT GTT GCT ACC TGT AAC ACG AAA GAT CAG GAC AAA TTA TCT AAG	480
Tyr Gly Val Ala Thr Cys Asn Thr Lys Asp Gln Asp Lys Leu Ser Lys	
145 150 155 160	
AAT GGC TCT TAT CCT TCT GGA CAC ACC GCA ATT GGC TGG GCA TCT GCA	528
Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ala Ile Gly Trp Ala Ser Ala	
165 170 175	
CTC GTA TTG TCA GAA ATT AAC CCA GAA AAC CAA GAT AAA ATT TTA AAA	576
Leu Val Leu Ser Glu Ile Asn Pro Glu Asn Gln Asp Lys Ile Leu Lys	
180 185 190	
CGT GGT TAT GAA CTT GGC CAA AGC CGA GTC ATC TGT GGT TAC CAT TGG	624
Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp	
195 200 205	
CAA AGT GAT GTT GAT GCA GCT CGT ATC GTT GCA TCG GGT GCG GTA GCA	672
Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Ala Ser Gly Ala Val Ala	
210 215 220	
ACT TTA CAC TCC AAC CCT GAA TTC CAA AAA CAG TTA CAA AAA GCC AAA	720
Thr Leu His Ser Asn Pro Glu Phe Gln Lys Gln Leu Gln Lys Ala Lys	
225 230 235 240	

GAC GAA TTT GCT AAA CTG AAA AAA TAG

747

Asp Glu Phe Ala Lys Leu Lys Lys

245

(2) 配列番号18の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 248 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(vi) 起源:

(A) 生物名: プロビデンシア・スチュアルティ

(B) 株名: ATCC 29851

(xi) 配列: SEQ ID NO:18:

Met Lys Lys Leu Leu Ala Val Phe Cys Ala Gly Ala Phe Val Ser Thr

1 5 10 15

Ser Val Phe Ala Ala Ile Pro Pro Gly Asn Asp Val Thr Thr Lys Pro

20 25 30

Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ser Gln Ala Ile Asp Ser Leu Ala Leu

35 40 45

Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Leu Phe Leu Asn Asp Gln

50 55 60

Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Glu

65 70 75 80

Gln Ala Ala Lys Asp Ala Asp Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Asn Ala

85 90 95

Phe Ser Glu Ala Phe Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Glu

100 105 110

Ile His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala

115 120 125

Thr Arg Ser Ala Lys Glu Lys Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe
 130 135 140
 Tyr Gly Val Ala Thr Cys Asn Thr Lys Asp Gln Asp Lys Leu Ser Lys
 145 150 155 160
 Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ala Ile Gly Trp Ala Ser Ala
 165 170 175
 Leu Val Leu Ser Glu Ile Asn Pro Glu Asn Gln Asp Lys Ile Leu Lys
 180 185 190
 Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp
 195 200 205
 Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Ala Ser Gly Ala Val Ala
 210 215 220
 Thr Leu His Ser Asn Pro Glu Phe Gln Lys Gln Leu Gln Lys Ala Lys
 225 230 235 240
 Asp Glu Phe Ala Lys Leu Lys Lys
 245

(2) 配列番号19の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 747 bases
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 二本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Genomic DNA

(vi) 起源:

- (A) 生物名: エンテロバクター・アエロゲネス
- (B) 株名: IFO 12010

(ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号: CDS
- (B) 存在位置: 1..744

(xi) 配列: SEQ ID NO:19:

ATG AAA AAG CGC GTT CTC GCC CTC TGC CTC GCC AGC CTG TTT TCC GTT	48
Met Lys Lys Arg Val Leu Ala Leu Cys Leu Ala Ser Leu Phe Ser Val	
1 5 10 15	
AAC GCT TTC GCG CTG GTC CCT GCC GGC AAT GAT GCA ACC ACC AAA CCG	96
Asn Ala Phe Ala Leu Val Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro	
20 25 30	
GAT CTC TAT TAT CTG AAA AAT GCA CAG GCC ATC GAT AGT CTG GCG CTG	144
Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ala Gln Ala Ile Asp Ser Leu Ala Leu	
35 40 45	
TTG CCG CCG CCG CCG GAA GTT GGC AGC ATC GCA TTT TTA AAC GAT CAG	192
Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln	
50 55 60	
GCG ATG TAT GAG AAA GGA CGG CTG TTG CGC AAT ACC GAA CGT GGC AAG	240
Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys	
65 70 75 80	
CTG GCG GCT GAA GAT GCT AAC CTG AGC GCC GGC GGC GTC GCG AAT GCC	288
Leu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ala Gly Gly Val Ala Asn Ala	
85 90 95	
TTC TCC AGC GCT TTT GGT TCG CCC ATC ACC GAA AAA GAC GCG CCG CAG	336
Phe Ser Ser Ala Phe Gly Ser Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Gln	
100 105 110	
TTA CAT AAG CTG CTG ACA AAT ATG ATT GAG GAT GCC GGC GAT CTG GCC	384
Leu His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala	
115 120 125	
ACC CGC AGC GCG AAA GAG AAA TAT ATG CGC ATT CGC CCG TTT GCG TTC	432
Thr Arg Ser Ala Lys Glu Lys Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe	
130 135 140	
TAC GGC GTT TCA ACC TGT AAC ACT ACC GAG CAG GAC AAG CTG TCG AAA	480
Tyr Gly Val Ser Thr Cys Asn Thr Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys	

145	150	155	160	
AAC GGA TCT TAC CCT TCC GGC CAT ACC TCT ATC GGT TGG GCA ACC GCG				528
Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala				
	165	170	175	
CTG GTA CTG GCG GAG ATC AAT CCG CAG CGG CAA AAC GAA ATT CTC AAA				576
Leu Val Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln Arg Gln Asn Glu Ile Leu Lys				
	180	185	190	
CGC GGC TAT GAA TTG GGC GAA AGC CGG GTT ATC TGC GGC TAT CAT TGG				624
Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Glu Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp				
	195	200	205	
CAG AGC GAT GTC GAT GCG GCG CGG ATA GTC GGC TCG GCG GTG GTG GCG				672
Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Val Val Ala				
	210	215	220	
ACC CTG CAT ACC AAC CCG GCC TTC CAA CAG CAG TTG CAG AAA GCA AAG				720
Thr Leu His Thr Asn Pro Ala Phe Gln Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys				
225	230	235	240	
GAT GAA TTC GCC AAA ACG CAG AAG TAA				747
Asp Glu Phe Ala Lys Thr Gln Lys				
	245			

(2) 配列番号20の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 248 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(vi) 起源:

(A) 生物名: エンテロバクター・アエロゲネス

(B) 株名: IFO 12010

(xi) 配列: SEQ ID NO:20:

- 69 -

Met Lys Lys Arg Val Leu Ala Leu Cys Leu Ala Ser Leu Phe Ser Val
 1 5 10 15
 Asn Ala Phe Ala Leu Val Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro
 20 25 30
 Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ala Gln Ala Ile Asp Ser Leu Ala Leu
 35 40 45
 Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln
 50 55 60
 Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys
 65 70 75 80
 Leu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ala Gly Gly Val Ala Asn Ala
 85 90 95
 Phe Ser Ser Ala Phe Gly Ser Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Gln
 100 105 110
 Leu His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala
 115 120 125
 Thr Arg Ser Ala Lys Glu Lys Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe
 130 135 140
 Tyr Gly Val Ser Thr Cys Asn Thr Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys
 145 150 155 160
 Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala
 165 170 175
 Leu Val Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln Arg Gln Asn Glu Ile Leu Lys
 180 185 190
 Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Glu Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp
 195 200 205
 Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Val Val Ala
 210 215 220
 Thr Leu His Thr Asn Pro Ala Phe Gln Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys
 225 230 235 240

Asp Glu Phe Ala Lys Thr Gln Lys

245

(2) 配列番号21の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 747 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Genomic DNA

(vi) 起源:

(A) 生物名: クレブジエラ・プランティコラ

(B) 株名: IFO 14939

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 1..744

(xi) 配列: SEQ ID NO:21:

ATG AAA AAG CGT GTA CTC GCC CTT TGC CTT GCC AGC CTC TTT TCA GTT	48
Met Lys Lys Arg Val Leu Ala Leu Cys Leu Ala Ser Leu Phe Ser Val	
1 5 10 15	
AGC GCC TTT GCG CTG GTT CCC GCC GGC AAT GAT GCC ACC ACC AAG CCC	96
Ser Ala Phe Ala Leu Val Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro	
20 25 30	
GAT CTC TAC TAT CTG AAA AAT GCC CAG GCC ATT GAC AGC CTG GCG CTG	144
Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ala Gln Ala Ile Asp Ser Leu Ala Leu	
35 40 45	
TTG CCA CCG CCG CCG GAA GTG GGC AGC ATT GCG TTT TTA AAC GAT CAG	192
Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln	
50 55 60	

GCG ATG TAT GAG AAA GGC CGT CTG CTG CGC GCC ACC GCC CGC GGC AAG 240
 Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Leu Leu Arg Ala Thr Ala Arg Gly Lys
 65 70 75 80
 TTG GCG GCA GAA GAT GCC AAC CTG AGC GCG GGT GGC GTG GCC AAC GCC 288
 Leu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ala Gly Gly Val Ala Asn Ala
 85 90 95
 TTC TCC GCA GCA TTC GGC TCC CCG ATC AGC GAA AAA GAC GCC CCG GCG 336
 Phe Ser Ala Ala Phe Gly Ser Pro Ile Ser Glu Lys Asp Ala Pro Ala
 100 105 110
 CTG CAC AAA CTG CTC ACC AAC ATG ATT GAA GAC GCG GGC GAT CTG GCG 384
 Leu His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala
 115 120 125
 ACC CGA GGC GCG AAA GAG AAG TAT ATG CGT ATT CGT CCG TTT GCC TTC 432
 Thr Arg Gly Ala Lys Glu Lys Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe
 130 135 140
 TAC GGC GTG TCC ACC TGC AAT ACC ACC GAA CAG GAT AAG CTG TCG AAA 480
 Tyr Gly Val Ser Thr Cys Asn Thr Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys
 145 150 155 160
 AAC GGC TCC TAC CCT TCC GGA CAC ACC TCT ATC GGC TGG GCG ACC GCC 528
 Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala
 165 170 175
 CTG GTG CTG GCC GAA ATC AAC CCG CAG CGC CAG AAT GAG ATT CTC AAG 576
 Leu Val Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln Arg Gln Asn Glu Ile Leu Lys
 180 185 190
 CGC GGC TAT GAG CTC GGT GAA AGT CGG GTG ATC TGC GGT TAC CAC TGG 624
 Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Glu Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp
 195 200 205
 CAG AGC GAT GTT GAC GCC GCG CGG ATT GTC GGC TCG GCG GTG GTT GCA 672
 Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Val Val Ala
 210 215 220

ACC CTG CAT ACC AAT CCG GCC TTC CAG CAG CAG CTG CAA AAA GCC AAA 720
 Thr Leu His Thr Asn Pro Ala Phe Gln Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys
 225 230 235 240
 GAC GAG TTT GCG AAA CAG CAG AAA TAG 747
 Asp Glu Phe Ala Lys Gln Gln Lys
 245

(2) 配列番号22の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 248 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(vi) 起源:

(A) 生物名: クレブジエラ・プランティコラ

(B) 株名: IFO 14939

(xi) 配列: SEQ ID NO:22:

Met Lys Lys Arg Val Leu Ala Leu Cys Leu Ala Ser Leu Phe Ser Val
 1 5 10 15
 Ser Ala Phe Ala Leu Val Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro
 20 25 30
 Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ala Gln Ala Ile Asp Ser Leu Ala Leu
 35 40 45
 Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln
 50 55 60
 Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Leu Leu Arg Ala Thr Ala Arg Gly Lys
 65 70 75 80
 Leu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ala Gly Gly Val Ala Asn Ala
 85 90 95

- 73 -

Phe Ser Ala Ala Phe Gly Ser Pro Ile Ser Glu Lys Asp Ala Pro Ala
 100 105 110
 Leu His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala
 115 120 125
 Thr Arg Gly Ala Lys Glu Lys Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe
 130 135 140
 Tyr Gly Val Ser Thr Cys Asn Thr Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys
 145 150 155 160
 Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala
 165 170 175
 Leu Val Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln Arg Gln Asn Glu Ile Leu Lys
 180 185 190
 Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Glu Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp
 195 200 205
 Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Val Val Ala
 210 215 220
 Thr Leu His Thr Asn Pro Ala Phe Gln Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys
 225 230 235 240
 Asp Glu Phe Ala Lys Gln Gln Lys
 245

(2) 配列番号23の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 735 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Genomic DNA

(vi) 起源:

(A)生物名：セラチア・フィカリア

(B)株名：IAM 13540

(ix) 配列の特徴：

(A) 特徴を表す記号：CDS

(B) 存在位置：1..732

(xi) 配列：SEQ ID NO:23:

ATG AAA AAA ATA TTA TTA GCC ACA TTA AGC TGC GCC GCG TTG ACG CAG	48
Met Lys Lys Ile Leu Leu Ala Thr Leu Ser Cys Ala Ala Leu Thr Gln	
1 5 10 15	
TTT TCC TTT GCC GCC AAA GAT GTC ACT ACC CAC CCT GAG GTT TAT TTT	96
Phe Ser Phe Ala Ala Lys Asp Val Thr Thr His Pro Glu Val Tyr Phe	
20 25 30	
CTG CAA GAA TCA CAG TCC ATC GAC AGC CTG GCA CTA TTG CCG CCG CCG	144
Leu Gln Glu Ser Gln Ser Ile Asp Ser Leu Ala Leu Leu Pro Pro Pro	
35 40 45	
CCG GCG ATG GAC AGC ATT GAT TTC CTG AAT GAC AAA GCG CAA TAC GAC	192
Pro Ala Met Asp Ser Ile Asp Phe Leu Asn Asp Lys Ala Gln Tyr Asp	
50 55 60	
GCC GGG AAA ATA GTG CGC AAT ACT CCG CGT GGC AAG CAG GCT TAT GAT	240
Ala Gly Lys Ile Val Arg Asn Thr Pro Arg Gly Lys Gln Ala Tyr Asp	
65 70 75 80	
GAC GCC CAC GTT GCC GGG GAC GGC GTT GCC GCC GCA TTT TCC AAC GCC	288
Asp Ala His Val Ala Gly Asp Gly Val Ala Ala Ala Phe Ser Asn Ala	
85 90 95	
TTC GGC CTA GAA ATA GCC CAA CGG AAA ACG CCG GAG CTG TTT AAG CTG	336
Phe Gly Leu Glu Ile Ala Gln Arg Lys Thr Pro Glu Leu Phe Lys Leu	
100 105 110	
GTG ATG AAA ATG CGT GAA GAC GCC GGC GAT TTG GCG ACC CGC AGC GCC	384
Val Met Lys Met Arg Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala Thr Arg Ser Ala	
115 120 125	

AAA AAT CAC TAT ATG CGC ATT CGC CCC TTT GCG TTT TAT AAC GAA GCG	432
Lys Asn His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe Tyr Asn Glu Ala	
130 135 140	
ACC TGC CGA CCG GAC GAA GAA AGC ACC CTG TCG AAG AAC GGT TCT TAC	480
Thr Cys Arg Pro Asp Glu Glu Ser Thr Leu Ser Lys Asn Gly Ser Tyr	
145 150 155 160	
CCT TCC GGC CAT ACC ACC ATC GGC TGG GCG ACC GCG CTG GTG CTG GCT	528
Pro Ser Gly His Thr Thr Ile Gly Trp Ala Thr Ala Leu Val Leu Ala	
165 170 175	
GAA ATC AAC CCC GCC AGG CAG GGT GAA ATC CTG CAG GCG GGC TAT GAT	576
Glu Ile Asn Pro Ala Arg Gln Gly Glu Ile Leu Gln Arg Gly Tyr Asp	
180 185 190	
ATG GGC CAA AGC CGG GTT ATC TGC GGT TAT CAC TGG CAA AGC GAC GTG	624
Met Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp Gln Ser Asp Val	
195 200 205	
ACT GCG GCG CGC ATG GCG GCG TCG GCC ATG GTG GCG CGT TTG CAT GCC	672
Thr Ala Ala Arg Met Ala Ala Ser Ala Met Val Ala Arg Leu His Ala	
210 215 220	
GAA CCC ACC TTC GCC GCC CAG CTG CAA AAG GCC AAA GAC GAA TTC AAC	720
Glu Pro Thr Phe Ala Ala Gln Leu Gln Lys Ala Lys Asp Glu Phe Asn	
225 230 235 240	
GGC CTG AAA AAG TAA	735
Gly Leu Lys Lys	

(2) 配列番号24の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 244 amino acids

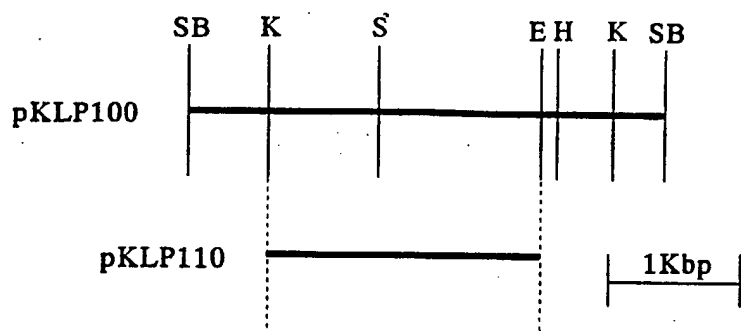
(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

9 / 1 1

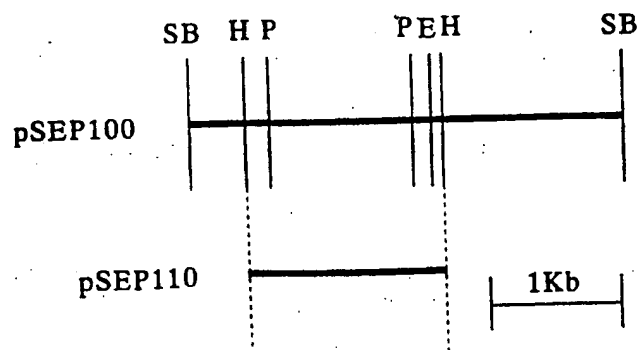
FIG. 10



SB: *Sau*3AI / *Bam*HI junction E: *Eco*RI H: *Hind*III K: *Kpn*I
S: *Sac*I

10/11

FIG. 11



SB: *Sau3AI* / *Bam*HI junction E: *EcoRI* H: *HindIII* P: *PstI*

1 1 / 1 1

F I G. 1 2

E. aerogenes	1:MKKRVLALCLASLFSVNAFALVPAGNDATTKPDLYYLKNAQAIDSLALLP	50
E. blattae	1:MKKRVLAVCF AALFSSQALALVATGNDTTTKPDLYYLKNSAIDSLALLP	50
K. planticola	1:MKKRVLALCLASLFSVSAFALVPAGNDATTKPDLYYLKNAQAIDSLALLP	50
M. morgani	1:MKKNIIAGCLFSLFSLSALAAIPAGNDATTKPDLYYLKNEQAIDSLKLLP	50
P. stuartii	1:MKKLLAVFCAGAFVSTSVFAAIPPGNDVTTKPDLYYLKNSQAIDSLALLP	50
S. ficaria	1:MKK-ILLA-TLSCAALTQFS--FAAKDVTTHPEVYFLQESQSIDSLALLP	46
	*** * * * * *	

E. aerogenes	51:PPPEVGSIAFLNDQAMYEGRLLRNTERGKLAEDANLSAGGVANAFSSA	100
E. blattae	51:PPPAVGSIAFLNDQAMYEQGRLLRNTERGKLAEDANLSAGGVANAFSGA	100
K. planticola	51:PPPEVGSIAFLNDQAMYEGRLLRATARGKLAEDANLSAGGVANAFSAA	100
M. morgani	51:PPPEVGSIQFLNDQAMYEGRMLRNTERGKQAQADADLAAGGVATAFSGA	100
P. stuartii	51:PPPEVGSILFLNDQAMYEGRLLRNTERGEQAADADLAAGGVANAFSEA	100
S. ficaria	47:PPPAMDSIDFLNDKAQYDAGKIVRNTPRGKQAYDDAHVAGDGVAAAFSNA	96
	*** * * * * *	

E. aerogenes	101:FGSPITEKDAPQLHKLLTNMIEDAGDLATRSAGEKYMRI RPFAYGVSTC	150
E. blattae	101:FGSPITEKDAPALHKLLTNMIEDAGDLATRSADHYMRI RPFAYGVSTC	150
K. planticola	101:FGSPISEKDAPALHKLLTNMIEDAGDLATRGAGEKYMRI RPFAYGVSTC	150
M. morgani	101:FGYPITEKDSPELYKLLTNMIEDAGDLATRSAGEHYMRI RPFAYGTETC	150
P. stuartii	101:FGYPITEKDAPEIHKLLTNMIEDAGDLATRSAGEKYMRI RPFAYGVATC	150
S. ficaria	97:FGLEIAQRKTPELFKLVKMRDAGDLATRSAGNHYMRI RPFAYNEATC	146
	** * * * * *	

E. aerogenes	151:NTTEQDKLSKNGSYPSGHTSIGWATALVLAIEINPQRQNEILKRGYELGES	200
E. blattae	151:NTTEQDKLSKNGSYPSGHTSIGWATALVLAIEINPQRQNEILKRGYELGQS	200
K. planticola	151:NTTEQDKLSKNGSYPSGHTSIGWATALVLAIEINPQRQNEILKRGYELGES	200
M. morgani	151:NTKDQKKLSTNGSYPSGHTSIGWATALVLAIEVNPANQDAILERGYQLGQS	200
P. stuartii	151:NTKDQDKLSKNGSYPSGHTAIGWASALVLEINPENQDKILKRGYELGQS	200
S. ficaria	147:RPDEESTLSKNGSYPSGHTTIGWATALVLAIEINPARQGEILQRGYDMCQS	196
	** * * * * *	

E. blattae	201:RVICGYHWQSDVDAARVGS AVVATLHTNP AFQQQLQKAKAEFAQHQQK	249
K. planticola	201:RVICGYHWQSDVDAARIVGS AVVATLHTNP AFQQQLQKAKDEFAKQQK-	248
M. morgani	201:RVICGYHWQSDVDAARIVGS AAVATLHSDP AFQAQLAKAKQEF AQKSQK	249
E. aerogenes	201:RVICGYHWQSDVDAARIVGS AVVATLHTNP AFQQQLQKAKDEFAKTQK-	248
P. stuartii	201:RVICGYHWQSDVDAARIVASGAVATLHSNPEFQKQLQKAKDEFA-KLKK	248
S. ficaria	197:RVICGYHWQSDVTAARMAASAMVARLHA EPTFAAQLQKAKDEF-NGLKK	244

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01402

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N9/16, C12N15/55, C12P19/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N9/00-9/99, C12N15/52-15/61, C12P19/30-19/36

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, WPI, WPI/L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Microbiology, Vol. 140, No. 6 (1994), p. 1341-1350	7 - 13
A	JP, 52-23095, A (Ajinomoto Co., Inc.), February 21, 1977 (21. 02. 77) (Family: none)	1 - 6
A	JP, 50-22115, B (Marukin Shoyu Co., Ltd.), July 28, 1975 (28. 07. 75) (Family: none)	1 - 6
A	JP, 47-4511, B (Yamasa Shoyu Co., Ltd.), February 27, 1967 (27. 02. 67) (Family: none)	1 - 6
A	JP, 46-20038, B (Yamasa Shoyu Co., Ltd.), June 4, 1971 (04. 06. 71) (Family: none)	1 - 6
A	JP, 7-231793, A (Ajinomoto Co., Inc.), September 5, 1995 (05. 09. 95) (Family: none)	1 - 6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

August 16, 1996 (16. 08. 96)

Date of mailing of the international search report

August 27, 1996 (27. 08. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N9/16, C12N15/55, C12P19/32

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N9/00-9/99, C12N15/52-15/61,
G12P19/30-19/36

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE,
WPI, WPI/L

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Microbiology, Vol. 140, No. 6 (1994), p. 1341-1350	7-13
A	JP, 52-23095, A (味の素株式会社) 21. 2月. 1977 (21. 02. 77) (ファミリーなし)	1-6
A	JP, 50-22115, B (丸金醤油株式会社) 28. 7月. 1975 (28. 07. 75) (ファミリーなし)	1-6
A	JP, 47-4511, B (ヤマサ醤油株式会社) 27. 2月. 1967 (27. 02. 67) (ファミリーなし)	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 08. 96

国際調査報告の発送日

27.08.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

村上騎見高



4B 8827

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 46-20038, B (ヤマサ醤油株式会社) 4. 6月. 1971 (04. 06. 71) (ファミリーなし)	1-6
A	JP, 7-231793, A (味の素株式会社) 5. 9月. 1995 (05. 09. 95) (ファミリーなし)	1-6